

#16

EXTRUSION TECHNIQUES FOR PRODUCING LIPOSOMES

Publication number: JP61502452T

Publication date: 1986-10-30

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: A61K9/00; A61K9/10; A61K9/127; A61K9/133;
B01D61/14; B01J13/02; A61K9/00; A61K9/10;
A61K9/127; A61K9/133; B01D61/14; B01J13/02;
(IPC1-7): A61K9/10; B01D13/02

- European: A61K9/127P; B01D31/00

Application number: JP19850502838T 19850619

Priority number(s): US19840622502 19840620; US19840622690 19840620

Also published as:

WO8600238 (A1)
EP0185756 (A1)
ES8608922 (A)
EP0185756 (A4)
EP0185756 (A0)

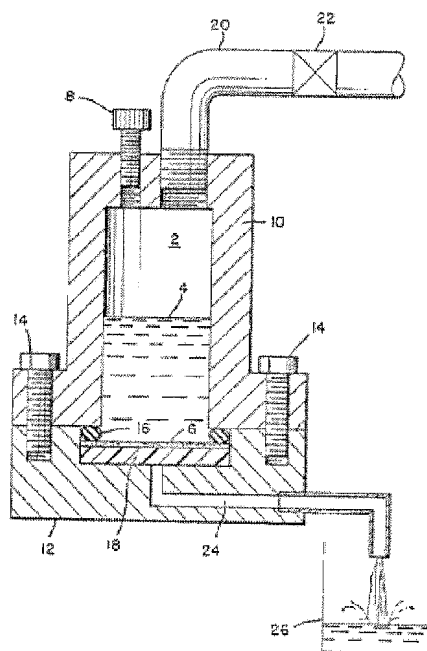
more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP61502452T

Abstract of corresponding document: **WO8600238**

Extrusion techniques for producing populations of liposomes having a substantially unimodal size distribution and for producing unilamellar liposomes. The unimodal size distribution is achieved by repeatedly passing previously formed liposomes through one or a plurality of filters, all of which have the same pore size. The unilamellar liposomes are produced by using a filter which has a pore size equal to or less than about 100 nm. In accordance with other aspects of the disclosure, liposomes are prepared directly from a lipid powder or pellet and buffer without the use of any solvents, detergents or other extraneous materials.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

③ 日本国特許庁(JP)

④ 特許出願公表

⑤ 公表特許公報(A)

昭61-502452

⑥ 公表 昭和61年(1986)10月30日

⑦ Int. Cl. ¹	識別記号	特許整理番号	審査請求 未請求	⑧ 国際出願
B 61 D 13/02		Z-8014-4D	予備審査請求 未請求	PCT/US85/01161
A 61 K 9/10	333	8742-4C		WO86/00238
				⑨ 国際公開日 昭61(1986)1月16日

(全23頁)

⑩ 発明の名称 リボソームを製造するための押出技術

⑪ 特 願 昭60-562838

⑫ 翻訳文提出日 昭61(1986)2月20日

⑬ 出 願 昭60(1985)6月19日

⑭ 国際出願 PCT/US85/01161

⑮ 国際公開番号 WO86/00238

⑯ 国際公開日 昭61(1986)1月16日

優先権主張 ⑰ 1984年6月20日⑱ 米国(US)⑲ 022502

⑳ 発 明 者 クリス、ピーター アール

カナダ国 ブリテイッシュ コロンビア ブイ6ジエイ 3アール
2、バンクーバー、ウォルナツト ストリート 1329㉑ 出 願 人 ゼ リボソーム カンパニー
インコーポレーテッドアメリカ合衆国 ニュージャージー州 08540 プリンストン、プ
リンストン フォレストラルセンター、ワンリサーチウェイ (番地
なし)

㉒ 代 理 人 弁理士 入田 幹雄 外2名

㉓ 指 定 国 A T(広域特許), B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K, F R(広域特許), G B(広域特
許), J T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許)

最終頁に続く

特許(内容に変更なし)

図 1

1. 100nmに等しいまたはそれより小さなある一つの孔徑を有するフィルターを通して圧力下にリボソームを搬送し通過させることよりなるリボソームの集団のラメラ度の低減方法。
2. リボソームの集団が2個より多くフィルターを通過させられるものである請求の範囲第1項に記載の方法。
3. フィルターが直線的通過流路を有するものである請求の範囲第1項に記載の方法。
4. フィルターがポリカーボネートフィルターである請求の範囲第3項に記載の方法。
5. ラメラ度が請求の範囲第1項の方法により低減されたリボソームの集団。
6. a) マルチラメラリボソームを調製し、そして
b) 該リボソームを100nmに等しいまたはそれより小さなある一つの孔徑を有するフィルターを通して圧力下に搬送し通過させる、段階からなる実質的にユニラメラなリボソームの集団の調製方法。
7. リボソームが2個より多くフィルターを通過させられるものである請求の範囲第6項に記載の方法。
8. フィルターが直線的通過流路を有するものである請求の範囲第6項に記載の方法。
9. フィルターがポリカーボネートフィルターである請求

の範囲第8項に記載の方法。

10. 捕獲容量を増加させるためにリボソームを凍結解凍サイクルにかけける付加的段階を含むものである請求の範囲第6項に記載の方法。

11. 請求の範囲第6項の方法により調製された実質的にユニラメラなリボソームの集団。

12. a) 脂質粉末またはポレットと水性緩衝液の混合物を調製し、そして

b) 該混合物を一つのフィルターを通して圧力下に搬送し通過させる、

段階よりなる溶剤、洗浄剤またはその他の無機塩を物質を使用することのないリボソームの調製方法。

13. フィルターが直線的通過流路を有するものである請求の範囲第12項に記載の方法。

14. フィルターがポリカーボネートフィルターである請求の範囲第13項に記載の方法。

15. 捕獲容量を増加させるためにリボソームを凍結解凍サイクルにかけける付加的段階を含むものである請求の範囲第12項に記載の方法。

16. フィルターが約100nmより小さいかまたは等しいある一つの孔徑を有し、混合物は、このフィルターを2個より多く通過させられ、そして得られるリボソームが実質的にユニラメラなものである請求の範囲第12項に記載の方法。

特表昭61-502452 (2)

特許(内容に変更なし)
 発明 赤田 隆雄

リボソームを製造するための押出装置

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、リボソームに関するものであり、特に、ユニラメラリボソームの迅速な製造および阻害されたサイズ分布を有するリボソームの製造のための押出技術に関するものである。

2. 先行技術の説明

当該分野において公知のように、リボソームは、水性液体をとり囲む脂質二重膜層を有する閉鎖した小胞体(ベシクル)である。一般に、以下の3つのタイプのリボソーム、すなわち1)それぞれのベシクルが、タマネギの皮の配置のように一つの膜の内側に他の膜が収納された複数の同心四重膜層を有するマルチラメラベシクル類(MLV類)、2)ベシクル1つあたりわずかに1つの二重膜層を有しかつ約50nm以下の範囲にある直径を有するスモールユニラメラベシクル類(SLV類)および3)これらまたベシクル1つあたりわずかに1つの二重膜層を有するものであるが、約50nm以上の、そして代表的には100nmおよびそれ以上の径である直径を有するラージユニラメラベシクル類(LLV類)が生成されている。

ような物質の媒体としてである。リボソームはまた自然発生生物学的膜システムの科学的モデルとして広範に用いられている。

これらの使用のそれぞれに関連して、限定された平均直径およびこの平均について限定されたサイズ分布を有するリボソームの有効な集団を有することが重要である。より特別には、ある選択された平均直径について実質的に単一モードの[unimodal]分布を有するリボソームの有効な集団を有することが重要である。

工業的適用および、特に薬理学的適用に関して、このような集団はリボソームに内包された薬物ないし毒物などの効果と安全性を高めるために必要とされる。さらに、リボソームの緻密に限定された集団の利用性は、合衆国食品および薬物検査局[the United States Food and Drug Administration regulatory agency]のような取締機関からリボソーム含有調製物に関する認可を得ることを著しく容易とする。特許的研究を包含するその他のリボソームの適用に就いて、リボソームの適用に特許づけられた集団の容易な利用性は、より標準化された製品および反復性の高い実験を導くものとなる。

本発明は、リボソームの製造に関する改良された方法に関するものである。特に本発明は、1)ラージおよびスモールの双方のタイプのユニラメラリボソームを製造するための改良された方法、および2)限定されたサイズ分布を

17. 請求の範囲第12項の方法により調製されたリボソーム。

18. 50nmより大きな平均直径について実質的に単一モードの分布を有するリボソームの集団。

19. 干渉光でのリボソームの集団の偏光の照度の図のこの集団の試料により散乱された光の強度における時間依存変動の自己相関関数の自然対数が2次多項式によって極めて適合されるものである請求の範囲第18項に記載の集団。

20. すべてのものが同一の孔径を有する1つまたは複数のフィルターを遊して、平均値について実質的に単一モードのリボソームの直径の分布を生じるのに十分な透過の図数リボソームを繰返し通過させることであるリボソームの集団の均質性を増加させる方法。

これらの調製および生成リボソームの種々の用途を包含する、これらの3つのタイプのリボソームに関する特許は、リボソームス、マルク ジェイ オストロフ、マーセル デッカー インコーポレーテッド、ニューヨーク、1983年 [Liposomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983] のテキストにおいてあることができ、この関連する部分は、本明細書中に関連により組み入れられる。スゾカ、ジュニア、アン・レア バイオフィーズ バイオエング、9: 467 (1988年) [Szoka, Jr., et al., Ann. Rev. Biochem. Biophys., 9: 467 (1988)] もまた参照すべきであり、この関連部分もまた、本明細書中に関連により組み入れられる。

発明してきた他のタイプのリボソームには、安定なプレラメラベシクル類 [stable plurilamellar vesicles] (SPLV類)、非相ベシクル類 [nonphasic vesicles] (MPV類) およびステロイドリボソーム類 [steroidal liposomes] である。これらのベシクル類およびこれらの調製方法の説明は、同様係属されそして一般披露された、それぞれ1983年3月24日、1983年8月8日および1984年8月12日に出版の米国特許出願-連発番号 478,496号、第321,170号および第399,891号にあることができ、そしてこれらの関連部分は、本明細書中に関連により組み入れられる。

リボソームの初期の使用の1つは、種々の物質、例えば、薬物、化粧品、薬理学的試料、生物学的活性化合物などの

特表昭61-502452(3)

有するリボソームを製造するための改良された方法に関するものである。

本発明より以前は、ラージユニラメラリボソーム類(ＬＵＶ類)は、一般には以下の３つの方法のうちひとつによって製造されていた。すなわち種々の溶剤を用いたの１)逆相蒸発(reverse-phase evaporation)法、２)洗淨剤希釈(detergent dilution)法および３)注入(infusion)法である。リボソームズ、上記、第１号第37～44頁を参照のこと。

逆相蒸発技術においては、水相懸濁液が、「乾化ミセル(inverted micelle)」すなわち、リン脂質単一層によって圍繞されることにより有機溶媒中に変性化された水の微滴を製造するために、リン脂質と有機溶媒の混合物中へ導入される。溶媒の蒸発は、液ミセルに合体して所望のリボソームを形成することをなさせる。例えばスゾカ、ジュニアラ、ブロック、ナトル、アカド、サイ、ユーエスエイ 75:4194(1976年) [Szoka, Jr., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194] およびババハジョアロウスら [Papanikolaou et al.,]の米国特許第 4,235,671号を参照のこと。

洗淨剤希釈アプローチにおいては、脂質、洗淨剤および水性溶液が共に混合されそして所望するペナクルを形成するために蒸発処理される。次に、洗淨剤を除去するために、ゲル濾過などのような分離装置が用いられそしてこれによ

り完成されたリボソームを製造する。

注入法においては、脂質は、溶剤、例えばペンタンあるいはジエチルエーテルに溶解され、そしてこの脂質-溶剤溶液は、溶剤に蒸発を起させる条件下で凍結液中へ投入し、そしてこれにより所望のリボソームを製造する。例えばダイマー、アナリス ニューヨーク アカデミー オブ サイエンス 303:250～258(1978年) [Deamer, *Annals New York Academy of Sciences*, 303:250-258(1978)] を参照のこと。

ＬＵＶ類を製造するために用いられているその他の技術は、融合(fusion)技術を含んでおり、これにおいてＳＵＶ類の集団は、ＬＵＶを形成するために細々のＳＵＶにお互いが混合することをなさせるように処理される。例えば、ビー、デストリオス ババハジョアロウスに対する米国特許第 4,078,052号は、ＳＵＶを筒形シリンダー中に混合するためにカルシウムイオンが用いられ、そして該シリンダーが次に所望のＬＵＶを形成するためにＥＤＴＡなどのようなカルシウムキレート化剤で処理される技術を選んでいる。はっきりとした解凍を伴う、ＳＵＶ類の急凍凍融がまた混合によってＬＵＶを製造するために用いられている。例えばユー、ピック、アーチパス、グブ、バイオケミストリー アンド バイオフィジクス, 212:186(1981年) [U. Pick, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 212:186(1981)] を参照のこと。

ＳＵＶ類の製造に関しては、ＬＵＶ類の融合と同様に、種々の技術が過去に用いられている。リボソームズ、上記、第１号第37～39頁、第45頁およびスゾカ、バイオフィジカ アクト, 561:569(1980年)を参照のこと。一連のポリカーボネートフィルターは、ＭＬＶ類をサイズ規制するために用いられている。エフ、オルソンら、バイオフィジカ アクト バイオフィジカ アクト, 557:9(1979年) [F. Olson, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 557:9(1979)] およびボスワースら、ジャーナル オブ ファラマコキユーティカル サイエンス, 71:806(1982年) [Bosworth, et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71:806(1982)] を参照のこと。前述の技術のそれぞれが、リボソームを製造するために用いられるが、これらの技術のいずれも全く満足するものではなかった。例えば、一般に用いられたＬＵＶ技術のそれぞれは、リボソームを形成する成分を脂質可溶化剤、すなわち、有機溶媒または洗淨剤のいずれかと混合させることを含むものであった。当業界において公知であるように、溶剤および洗淨剤は、リボソーム中に内包することが望まれる、例えば脂質のような、多くの物質に不利な影響を与え得るものであり、そしてそれゆえこれらの技術はこれらの物質と共に用いることができない。また、薬剤投与システムの一環などのような適用においては、これらの潜在的毒性物質の存在の可能性は望ましくないものである。

リボソームを製造するための基本的技術の低かに、種々の補助的技術がリボソームの特性を改良するために、リボソームの調製後処理に関して発明してきている。特に、以下により詳しく述べるように、上記に述べたＬＵＶ技術の多くが、例えば一連のポリカーボネートフィルターなどを

用いる過程による仕上げられたリボソームのサイズ規制を要求するものであった。リボソームズ、上記、第１号第37～39頁、第45頁およびスゾカ、バイオフィジカ アクト, 561:569(1980年)を参照のこと。一連のポリカーボネートフィルターは、ＭＬＶ類をサイズ規制するために用いられている。エフ、オルソンら、バイオフィジカ アクト バイオフィジカ アクト, 557:9(1979年) [F. Olson, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 557:9(1979)] およびボスワースら、ジャーナル オブ ファラマコキユーティカル サイエンス, 71:806(1982年) [Bosworth, et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71:806(1982)] を参照のこと。

前述の技術のそれぞれが、リボソームを製造するために用いられるが、これらの技術のいずれも全く満足するものではなかった。例えば、一般に用いられたＬＵＶ技術のそれぞれは、リボソームを形成する成分を脂質可溶化剤、すなわち、有機溶媒または洗淨剤のいずれかと混合させることを含むものであった。当業界において公知であるように、溶剤および洗淨剤は、リボソーム中に内包することが望まれる、例えば脂質のような、多くの物質に不利な影響を与え得るものであり、そしてそれゆえこれらの技術はこれらの物質と共に用いることができない。また、薬剤投与システムの一環などのような適用においては、これらの潜在的毒性物質の存在の可能性は望ましくないものである。

特表昭61-502452 (4)

さらに、これらの技術は用いられた溶剤あるいは洗浄剤を完全に除去することが不可能である長々しい過程をしばしば要するものであった。例えばアレックス、バイオチミカ、エト、バイオフィジカ、アクタ、501: 328 (1988年) [Aifian, et al., Biochimica et Biophysica Acta, 501: 328 (1988)] を参照のこと。さらに、様々な処方、脂質種に依存して変えられる。例えば、ある種の脂質（例えばコレステロール、ホスファチジルエタノールアミン (PE) およびホスファチジルセリン (PS)）のエーテルあるいはエタノールにおける限定された溶解性は、これらの溶剤を用いる技術の修正を必要とする。あるいはまた、オクテリルグルコシドなどのような非イオン性界面活性剤を用いる洗浄剤選択法は、これらが脂質膜の溶解を含み得るゆえに適用することに阻害される。はつきりいって、完成したリボソームから脂質溶解剤を分離する必要性は、これらの方法の有用性を著しく低減するものである。

これらの同様のラインに沿って、LUV技術の先行技術は一般に、種々のサイズのリボソームならびにリボソームの凝集をもたらし、それゆえに、一連のフィルターを用いての仕上げられたリボソームのサイズ規制の付加的段階が要求される。また、これは全部のプロセスをより時間を消耗しそしてより込み入ったものとする。

連動技術は同様の欠点を含むものである。例えば、カルシウムイオン/カルシウムキレート化剤技術は、溶解剤

および洗浄剤技術のように、仕上げられたリボソームを實際形成する脂質以外の脂質（この場合、キレート化剤と高濃度されたカルシウムイオン）の使用およびその後の除去を含むものである。溶解剤および洗浄剤での場合と同様に、これらの物質は、汚染の可能性源となり、膜技術の有用性を減らし、そして該技術をより込み入ったものとする。また、この技術は、リボソームの組成にいくつかのホスファチジルセリンを含むことを必要とする。

凍結-解凍技術に関しては、この技術は、この技術により製造されたリボソームの比容量能 [specific trapping capacity] が、約 $2 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{m}^2$ を超えるリン脂質濃度で急激に低下するという不利益に悩まされている。

SUV技術は同様の問題を有している。例えば高エネルギー音波処理は、リン脂質の酸化および分解を引き起こし、そして、リボソームの内部空間中に捕獲されることが望まれる脂質分子を濃縮し得るものである。また、音波処理アプローチを用いた行なわれた場合には、高エネルギー音波処理は、アロブ濃食を引き起こし得、そして放射性物質と組合せて溶型音波処理で行なわれた場合には、潜在的に危険なエアロゾルを産生し得るものとなる。低エネルギー音波処理は、遅く、リン脂質分子に特異的であり得、そして大量のリボソームを調製するために時間がかかることができない。さらに該音波処理アプローチは低い捕獲効率 [trapping efficiency] をもたねくものとなる。

注入型SUV法は、LUV注入法と同様な問題に悩まされている。高圧フレックサプレス技術は、該技術を復元可能とすることにおける困難性、SUVに酸化しなかった例し、Vを除去するための前処理の経過の必要性、使用される高圧に耐え得る容器で煩わしい技術の必要性、およびリボソームの製造の間に発生する脂質の成分の汚染による生成物汚染を含む、これら固有の問題群を有している。例えば、ボスワースら、ジャーナル、オブ、ファーマコキネティクス、サイエンス、71: 806 (1982年) [Bosworth, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 71: 806 (1982)] を参照のこと。また、この技術は低い捕獲効率を有するスモールなリボソームのみを製造し得るものである。

本発明のサイズ分布の見地に話を転じると、種々の製法が、リボソームのサイズおよび分布を制御する手段を提出しようとする試みにおいて過去に開発されている。これらの製法のいずれかが一方の多量あるいは他方における標準に逸せず失敗に終わっている。例えばチン-シェン、ハン、バイオケミストリー、8: 346 (1968年) [Ching-hsien Huang, Biochemistry, 8: 346 (1968)] は、振盪液中の脂質懸濁液を2 1/2 時間高速振盪し、分離されていない脂質を除去するために得られた空疎物を105、000×gで遠心分離し、十分に洗浄された0.1ミクロンサートリウフィルター [Sartorius filter] を通して上清液を濾過し、濾過物を予め脂質懸濁液で飽和させそして該技術

で洗浄され平衡化されたセファロース4B [Sephacrose 4B] カラムにおいて分子ふるいクロマトグラフィーにかけ、そしてカラムから抽出される第2分画を採集することを含むスモールユニラメラベシクル類 (SUV類) の均質な集団を製造するための多段階技術を述べている。この製法は、限定されたサイズ分布のリボソームの集団を製造するものではあるが、明らかに複雑で使用に時間を消費し、SUV類のみしか製造せず、そして長時間の連続処理またはセファロース4Bカラムへの吸着のいずれかの間におけるリボソームまたはその成分の化学変性の危険性をもつものであった。

ハンの技術における問題のいくつかを克服するための試みにおいて、バレンホルツら、バイオケミストリー、16: 2806 (1977年) [Barenholz, et al., Biochemistry, 16: 2806 (1977)] は、分子ふるいクロマトグラフィーに代えて高速遠心分離を用いる技術を開発させた。この技術によると、振盪液中の脂質分散液は、30分間高速振盪され、ラージアルテラメラリボソームおよび寄装処理アロブ粒子を除去するために100、000×gで15～30分間遠心分離し、そして100、000×gの遠心分離からの上清液が、用いられた脂質、緩衝液および温度に依存する1～4時間の範囲の時間の間150、000×gで再遠心分離される。

この後者の遠心分離は、3つのゾーンを生じさせ、その

特表昭61-502452 (5)

いちばん上部のゾーンが、リボソームの詰まる均質な集団を含んでおり、隣接する第2のゾーンの一部分を切り出すことなく注意深く除去されるべきである。この技術は、セファロース4Bカラムの使用を附添するものではあるが、これはまだ長期間で複雑であり、まだSU-V類のみしか製造できず、そしてまだ高純度により生じる問題を有している。これらと同じ途道に於いて、ワッツら、バイオケミストリー, 17: 1792 (1976年) [Watts, et al., Biochemistry, 17: 1792 (1976)] は、各段階の後、4℃で10分間、105、000×gで遠心分離することによってジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) からSU-V類の均質な集団を調製することを報告している。

SU-V類の均質な集団を得るための努力のほかに、よりラージナリボソーム、すなわち約50nmより大きな直径を有するリボソームの均質な集団を得るために数多くの試みがなされている。これらの努力の大多数は、漸減される孔径の連続のポリカーボネートフィルターの使用を含むものであった。

例えば、オルソンら、バイオケミカル エト バイオフィジカ アクタ, 557: 9 (1979年) [Olson, et al., Biochimica et Biophysica Acta, 557: 9 (1979)] は1.0、0.8、0.6、0.4および0.2ミクロンの孔径を有するポリカーボネートフィルターを通してのラージマチラメラリボソームの選択的抽出を述べている。アレ

ンゼラら、バイオケミカル エト バイオフィジカ アクタ, 555: 129 (1980年) [Brendzel, et al., Biochimica et Biophysica Acta, 555: 129 (1980)] も同様のこと。オルソンの研究所はまた、逆相凝縮により調製されたラージユニラメラリボソームのサイズ規正への従来の技術の適用も報告している。バイオケミカル エト バイオフィジカ アクタ, 601: 559 (1980年) [Biochimica et Biophysica Acta, 601: 559 (1980)] も同様のこと。この場合においては、0.4、0.2、0.1および0.05ミクロンの孔径を有するフィルターが用いられている。

文献に報告されたようなオルソンの研究は、ラージリボソームの単一モードの集団を製造するものと思われるが(例えば1979年論文の第18図および第30図、さらに1980年論文の第10図、第20図および第30図を参照のこと)、下記実施例10において詳細に述べるように、サイズ分布を測定するための技術として準弾性光散乱 [quasi-elastic light scattering] が用いられた場合、オルソンの技術によって調製されたリボソームは単一モードの分布を有していないという結果となることが解すべきことに用い出された。リボソームの大規模な工業的製造に関して、準弾性光散乱は現在において、サイズ分布を定義する唯一の公認のリアルタイムな物理的方法であり、それゆえ工業的適用に関して、オルソンの製法は、単一モードであるリボソームの集団を有効に製造するとは言い難いので

ある。

オルソンの連続的なポリカーボネートフィルターのアプローチの他に、比較的ラージナリボソームの均質な集団を得ることを希望して、その他の技術が試みられている。例えば、シュレリーら、ケミストリー アンド ファイジカス エズ リビズ, 12: 75 (1973年) [Schulley et al., Chemistry and Physics of Lipids, 12: 75 (1973)] は、ラージマチラメラホスファチジルコリンリボソームをサイズ規正するために、0.0、1.2、0.80、0.65および0.45ミクロンの孔径を有するミリポアフィルター [Millipore filter] の使用を述べている。

ローデンら、バイオケミストリー, 18: 4173 (1979年) [Rhoden et al., Biochemistry, 18: 4173 (1979)] は、コール酸ナトリウム溶液中にてホスファチジルコリンおよびコレステロールを安定化させ、そして次に中空糸透析によってその洗滌剤を除去することで34~128nmの間の孔径を有するリボソームの製造を報告している。このリボソームのサイズは、リン脂質/コレステロール比ならびに透析物のpHおよびイオン強度を調整することにより変えられた。より広い分布がよりラージナリボソームに関してまじることが観察された。

ボスワースら、ジャーナル オブ ファーマキョーティカルサイエンス, 71: 806 (1982年) [Bosworth, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 71: 806

(1982)] は、連続的ポリカーボネートフィルターサイズ規正技術と同様なタイプのフィルターでの透析を組合せた。リボソームは機械的攪拌またはバレンホルツら、エプイニピーエス レット, 99: 210 (1979年) [Baenschholz, et al., EPH Lett., 99: 210 (1979)] のフレンチプレス技術によって調製された。機械的攪拌によって製造されたものは、0.2~1.0ミクロンの孔径を有するフィルターを用いて、リボソームを最も小さなフィルターで2度通過させて、そしてある場合には、フィルターのそれぞれを2度通過させて、サイズ規正された。透析に関しては、0.05~3ミクロンの孔径を有するフィルターが用いられた。

エノクラ、プロク ナトル アカド サイ ユーエスエイ 76: 145 (1979年) [Enoch, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 145 (1979)] は、密着型膜されたベシクルの洗滌剤およびその後のセファロース4Bカラムにおけるゲル濾過によって100nmの直径を有するリボソームの調製を述べている。ハミルトンら、ジャーナル オブ リピッド リサーチ, 21: 981 (1980年) [Hamilton, et al., Journal of Lipid Research, 21: 981 (1980)] は、超遠心分離および2張または4%アガロースのカラムにおけるゲルクロマトグラフィーと組合せてフレンチプレスを用いて様々なサイズのリボソーム集団の調製を述べている。レーアスら、ジェイ セル ファイジオル, 73: 49 (1969年) [Reeves et al., J. Cell. Physiol., 73: 49

特表昭61-502452 (6)

(1969) は100 正規分布を有する巨大リボソーム(モード=1, 200nm)の集団の調製を報告しているが、1, 000nmより小さなベシクルはかるうじて測定され、そして500nmより小さなものにいたっては全く測定されなかった。

前述の製造のいくつかの商標が、スゾカウ、アン、レブ、バイオフィズ、バイオエンジェル、9: 487, 493~ 494 (1980年) [Szoaka, et al., Ann. Rev. Biochem., 50: 487, 493-494 (1980)] において見ることができ、リボソームス、マルク ジェイ、オストロム、マーセル、デッカー、インコーポレーテッド、ニューヨーク、1983年、第1章 [Lipssoes, Marc J, Ostra, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Chapter 1] も参照のこと。

発明の概要

当分野の前述の状態において、SUVおよびLUVタイプの双方のユニラメラリボソームの調製に関する改良された方法の実質的かつ継続された必要性があることは周知である。

さらに、少なくとも早くも1969年以来、測定されたサイズ分布を有するリボソームの集団を製造するための継続された努力があることもまた周知である。これらの努力の多くは、約500nmより大きな平均直径を有する集団を得ようとするものであった。該集団に関する要望それ自体と共に、

広い種類の製造条件に拘して留まれる、該タイプの集団を再現性よく生産する技術を提供することを一般的に適用できかつ簡便にする此行的な要望があった。

従って、ユニラメラリボソーム製造に関する改良された技術を提供することが本発明の目的の一つである。より詳しくは、容易に手に入れることができかつ比較的安価な装置で行なうことができ、露点層の段階を有し、単位時間当たりリボソームの高い産出量を有し、そしてリボソームを形成する物質を連続して処理するあるいは、溶剤、洗浄剤もしくはその他の無関係な物質と混合させることを必要としないユニラメラリボソームの製造に関する単純で、再現性のよい技術を提供することが、本発明の目的の一つである。

溶剤、洗浄剤もしくはその他の無関係な物質の使用を必要としないユニラメラおよびマルチラメラの双方のタイプのリボソームを製造する技術を提供することが、本発明の別の目的である。

限定されたサイズ分布を有するリボソームの集団を提供することが本発明のさらに別の目的である。このような集団を得るための簡便な方法を提供することが本発明のまた別の目的である。

上述およびその他の目的を達成するために、本発明は、本発明のいくつかの発見によると、予め形成されたリボソームの、経験的上限以下、特に約100nm以下の孔径を有するフィルターを通しての中鋼度での反復された抽出しを

含む実質的にユニラメラリボソームの集団を製造する方法を提供するものである。

このように、本発明は、ユニラメラリボソームを製造する公知のシステムより以上に、以下の利点、すなわち、1) 広範囲の過飽よりユニラメラリボソームを形成する能力、2) 高濃縮物を容易に透過するように高脂質濃度(例えば300mg/ml / 或のオーダー)を使用する能力、3) 高い抽出効率およびフィルターを通してのリボソームの自発または半自動再循環の使用による、ユニラメラベシクル、特にラージユニラメラベシクルの再現性のよいかつ無難に迅速な製造を提供する能力、4) フィルターの閉塞問題を最小限にしての単一孔径フィルターの使用による所望されたサイズのリボソームを製造する能力、5) 再循環および洗浄剤の使用をなくす能力、および6) 総じてかなり穏和なプロセスを提供する能力を含むいくつかの利点を与えるものである。

いくつかの態様においては、マルチラメラリボソームの集団を実質的にユニラメラリボソームの集団に完全に転化するよりも、完全にユニラメラの程度まで達することなく該集団のラメラ度 [lamellarity] を単に部分的に減じることが望まれる。約100nmの孔径を有するフィルターが、本発明のこの発見によりなお使用されるが、フィルターを通過する回数は減じられる。

本発明の他の発見のいくつかによると、本発明は、脂質

の粉末またはペレットを水性懸濁液と単に混合し、そして次に脂質/緩衝液混合物をフィルターを通して抽出し透過させるために脂質/緩衝液混合物に十分な圧力を適用することにより、直接脂質の粉末またはペレットよりリボソームを製造する方法を提供するものである。フィルターが約100nmより小さな孔径を有するものであると、実質的にユニラメラリボソームが製造される。フィルターが約100nmより有意に大きな、例えば200nmのオーダーにある孔径を有するものであると、マルチラメラリボソームが製造される。重要なことは、いずれの場合においても、リボソームは完全に空割を含まないものであり、それゆえ、MLV類を製造するために感度において使用されてきたような、クロロホルムすら、本発明のこれらの発見によるリボソームの製造には必要とされない。

本発明のさらに別の発見によると、本発明は500nmより大きな平均直径まわりに本質的に単一モードの分布を有するリボソームの集団を提供するものである。

本発明のまたさらに別の発見によると、本発明は、リボソームの集団のサイズ分布が本質的に単一モード性となるまで一定孔径の1ないしそれ以上のフィルターを通してリボソームを繰返して透過させることによるリボソームの脂質の均質性を増加する方法を提供するものである。

本発明に係る前述のおよびその他の目的ならびに利点の達成は、本発明の好ましい実施態様参照によって以下に示

特表昭61-502452(ア)

分に述べられるものである。

図面の簡単な説明

第1A図および第2A図は本発明の実施に資する装置の概略図である。第1A図において、リボソーム懸濁液は、手動によりフィルターを通して再懸濁され、一方第1B図において80、再懸濁は部分的に自動化されている。

第2図は、100nm(丸印)および200nm(角印)の孔径を有するポリカーボネートフィルターを通しての押出しの数の関数としての卵ホスファチルコリン(PC)マルチラメラベシクルから起こる³¹P NMR信号強度(5nm MnCl₂存在下)を示すものである。濃縮液は、換算係数(100nmフィルターを通しての10回押出しでの点に就いてn=6、300nm押出しでの点に就いてn=3)を示すものである。その逆のすべての実験に基づく点は、2つの別々の実験から得られた平均である。すべての場合において脂質濃度は30〜60μmol/瓶である。

第3図は、脂質成分を変えたマルチラメラベシクルのポリカーボネートフィルターを通しての反復押出しにより調製されたベシクルのフリーズフラクチャー(freeze fracture)顕微鏡写真図である。(a)100nmフィルターを通して押出された大豆ホスファチルコリン(PC)のMLV、(b)100nmフィルターを通して押出された大豆PC-大豆ホスファチルセリン(PS)(1:1)のMLV、(c)100nmフィルターを通して押出された大豆ホ

スファチルエタノールアミン(PE)-大豆PS(1:1)のMLV、(d)200nmフィルターを通して押出された大豆PCのMLV。(d)の部分における矢印は、内方のラメラを切る横割断(cross fracture)を示すものである。すべての顕微鏡写真図は、同様の拡大を有するものであり、また影つけの方向は、それぞれの部分の右下端における矢印によって示されている。それぞれの場合において、押出液は、40〜70μmol/瓶リン脂質を含有する脂質系において10回凍結された。

第4図は、100nm孔径を有するポリカーボネートフィルターを通しての10回の押出しの後に得られた大型PCベシクルのサイズ分布を示すものである。ベシクル濃度は、フリーズフラクチャー顕微鏡写真図よりパン・ベネチエラ(1980年)、ジェイ、ミクロス、118: 401〜404 [Van Venetie et al., (1980) *J. Microsc.*, 118: 401-404]の技法を用いて計測された。緑色および黄色の柱はそれぞれ、凍結解凍サイクルを受けたおよび受けなかったベシクルを表すものである。

第5図は、ラージマルチラメラベシクルにおけるおよび本発明の押出技法により調製されたラージユニラメラベシクル(LUVEIT)における水和化ジアルキルホスファチルコリン(DPPC)の熱変挙動を示すものである。MLVは、NaCl緩衝液の存在下50℃で沈降後の底部において乾燥脂質フィルムを加熱することによって形成さ

れ、一方LUVEITは、50℃で100nm孔径のポリカーボネートフィルターを通しての該MLV(50nm 脂質/瓶)の反復的な押出し(10回)により形成された。2、0°K/分の冷却速度が用いられた。

第6図は、本発明に従い、凍結解凍を用いて(白丸)および用いないで(黒丸)調製されたリボソームに関する脂質濃度の関数としての捕獲効率を示すものである。¹⁴C-イヌリンが捕獲標識として用いられた。

第7図は、50nm(白丸)および300nm(黒丸)孔径を有するポリカーボネートフィルターを通しての押出しの回数の関数としての卵ホスファチルコリン(PC)マルチラメラベシクルから起こる³¹P NMR信号強度(5nm MnCl₂存在下)を示すものである。すべての場合において脂質濃度は100nm/瓶であった。

第8図および第9図は、それぞれ、50nmおよび300nmフィルターを通して製造された第7図のベシクルのフリーズフラクチャー顕微鏡写真図を示すものである。それぞれの場合において、図面の上方の部分(第8A図および第9A図)は、2つ凍結したポリカーボネートフィルターを通しての1回押出し(×1)後に調製されたものであり、また下方の部分(第8B図および第9B図)は、10回押出し(×10)後のものであった。

第10図は、卵ホスファチルコリン(PC)-コレステロール(1:1)LUVEIT中に捕獲された¹²⁵I-チラミル-イヌリン(¹²⁵I-TI)のラット肝臓(丸印)および尿中のその後の排泄(角印)からのクリアランスを示すものである。LUVEITは、本発明に従って調製されそして150〜175gの雄雄ウイスター[Wistar]ラットの雄雄肝臓へ100μl HBSS中0.5μmolのリン脂質の投与量で注射された。尿は代謝ケージ[metabolic cage]に集められた。血液は、回収されそして動物は、指示時間で屠殺されそして血液中の¹²⁵I-TIの全量はラット100g当たり4、5ngの血液を測定して測定された。結果は、注射された¹²⁵I-TI全量のパーセンテージ±標準偏差(n=4)として表わされる。

第11図は第10図のLUVEITの長期組織分布を示すものである。記号は、肝臓(丸印)、脾臓(三角印)、および腎臓(四角印)に相応する。結果は、生体内[*in vivo*]の¹²⁵I-TIの全量(排泄された量を注射された¹²⁵I-TIの全量より引いたもの)のパーセンテージを標準偏差(n=4)として表わされた。

好ましい実施態様の詳細な説明

上記に述べたように、本発明は、1)実質的にユニラメラリボソームの集団、および2)実質的に単一モードの分布を有するリボソームの集団(以下、本発明の「ユニラメラ」および「単一モード」の集団とそれぞれ呼称する。)

特表昭61-502452(B)

を製造する射出技法を提供するものである。さらに、本発明は、高剤、洗剤あるいはその他の脂質含有物質を投与することなく製造されること（以下、本発明の「無脂剤性」の発明と呼称する。）をリボソームに付与するものである。

実質的にユニラメラリボソームは、予め形成されたリボソームを、約100nmより小さいかあるいは等しい大きさの孔徑を有するフィルターを通して中間圧での複数回射出にかけることにより製造される。

予め形成されたリボソームは、種々の組成を有することができ、またリボソームを調製することによって現在公知のあるいはこれに続いて発明する技術のいずれによっても調製されることができる。

例えば、予め形成されたリボソームは、MLVを調製する公知の技法、すなわち、選択された1ないしそれ以上の脂質をクロロホルムに溶解し次にクロロホルムを蒸発させることで適当な容積の内壁上に該選択された1ないしそれ以上の脂質を析出させ、内包されるべき水溶液を該容器に添加し、脂質を水和することによって水溶液になさせ、そして、所望のリボソームを製造するために、得られた脂質懸濁液を凍結あるいは凍結することにより形成されることができる。この技法は、リボソームの製造に関して当分野において公知な最も単純な条件ならびに最も単純な装置および手順を用いるものである。またこの技法は上記に論議された、塩処理あるいは洗淨所、溶解（クロロホルム以外）また

はその他の脂質含有物質の使用での問題を有するものである。

あるいはまた、本発明の無脂剤の発明に従い、フィルターを通して濾過し射出されるべきリボソームは、単に脂質粉末あるいはペレットを攪拌液といっしょに混合され、そして次に、直接、この混合物をフィルターを通して射出することにより調製される。フィルターが約100nmより小さな孔徑を有していると、この製法は、ユニラメラリボソームを製造し、一方実質的に100nmより大きな孔徑であると、マルチラメラバシクルが製造される。いずれの場合においてもこの製法は、クロロホルムを含むすべての溶媒の使用をなくするものである。

実質的に単一モードの分布を有するリボソームの集団の製造に関して、脂質を形成するリボソームは、種々の組成を有することができ、また現在公知のあるいは後に発明するマルチラメラ、ユニラメラもしくはその他のタイプのリボソーム、あるいはより一般的に脂質含有粒子の形態であり得る。例えば脂質含有粒子は、同軸凍結されて一級凍結されたそれぞれ1983年3月24日、1983年3月8日、1984年3月26日、および1984年4月12日に出版された米国特許出願一連番号第476,496号、第521,176号、第591,576号および第599,691号に開示されている（その関連部分は関連により本明細書中に組み入れられる。）タイプのステロイドリボソーム、安定なアルリメラリボソーム（SP

LV）、田根バシクル（MPV）あるいは脂質マトリックスキャリアー（LMC）の形態であり得る。

脂質集団の平均直径は、リボソームが用いられるべき用途に依存する。例えば、当業者によって認識されているように、診断学的用途に関しては、100nm～500nmの範囲の平均直径が望ましいと、一方、薬剤の貯蔵に関しては、より大きな直径、例えば500nm～1000nmの範囲が好ましく、そして細胞内取込みが望まれる用途に関しては、より小さな直径、例えば50nm～100nmの範囲が好ましい。その他の用途に関しては同様の範囲が当分野において認識されている。例えば、リボソーム、上記を参照のこと。

リボソームの集団の平均直径は、フリーズフラクチャーおよび単弾性光散乱を含む、当分野で公知の種々の技術によって計測されることができる。上記に述べた以下にさらに詳述するように、単弾性光散乱は、本発明の単一モードの発明の発明においては好ましく、そしてこれらの発明に関連して本明細書中に報告されるリボソーム直径の値は、この技術を用いて計測されたものである。

リボソームの実質的に単一モードの集団は、予め形成されたリボソームを、脂質のサイズ分布が実際に単一モード性となるまで一定孔徑のフィルターを通して繰返し通過させることにより調製される。一定孔徑のフィルターを通しての繰返し通過は、リボソームの最初のサイズ分布の双

峰性の（双モードの）特徴、ならびにより高いモードの特徴を、結果的に消失することを目指すものであることが望ましくことに思いつかれた。しかしながら、設定方法に随しては、1つの孔徑を使用しかつそれを繰返し使用することが肝要である。

予め形成されたリボソームは、リボソームの調製に関して現在公知のあるいはこれに続いて発明する技術のいずれによっても調製されることができる。例えば、予め形成されたリボソームは、上述した、マルチラメラリボソーム（MLV）の調製のための、同様の技術により形成されることができる。

あるいはまた、例えば逆相蒸発、注入法、および凍結凍結などのような、ラージユニラメラリボソーム（LUV）を調製するために用いられた技術が、予め形成されたリボソームを製造するために用いられる。リボソームを製造するためのこれらのおよびその他の方法の詳細は、リボソーム、上記、中に見ることができ、その関連部分は、関連により本明細書中に組み込まれる。さらにまた、予め形成されたリボソームは、上記の米国特許出願一連番号第476,496号、第521,176号、および第599,691号中に述べられた製法に従い製造されることができる。また、リボソームそれ自身を使用するよりほかに、上記の米国特許出願一連番号第591,576号に記載されるもののような他の脂質含有粒子が、本発明の実施において用いられ得る。このよう

特表昭61-502452 (G)

な場合、得られる単一モードの集団は、誤して、リボソームの集団というよりもどちらかと言えば用いられた最初の脂質含有粒子の集団と同様な特性を有する集団である。

予め形成されたリボソームを製造する技術の選択においては、単一モードの集団を作るために選択された孔径よりも、有意に小さな孔径を有するリボソームの実質的な数を生み出すことのないものを選択することが重要である。さもなければ、単一モードの集団中へ微小なリボソームを混入させるためにフィルターを通しての連続に高い回数通過が行なわれることになる。リボソームの集団に関するサイズ分析が比較的密に測定できるゆえに、この状態を満足する技術を選択することは当業者において適切になされるものである。

出発原料として予め形成されたリボソームを用いる他に、もし所望されるならば、リボソームの実質的に単一モードの集団は、上記した精製剤アプローチを用いて製製されることができる。すなわち、リボソームの該集団は、脂質粉末あるいはペレットおよび脂質膜から直接に、これらの成分をいっしょに混合して次に該混合物を直接選択された孔径を有するフィルターを通して所望の単一モード物を産するのに十分な回数通過させることにより、構築されることことができる。

ユニラメラリボソームあるいはリボソームの単一モードの分析を生起するために用いられるフィルターは、好まし

くは直線的通過通路 [straight through channel] を有するタイプのものである。スクレポア インコーポレーテッド、プレゼントン、カルフォルニア州 [Hucisporc, Inc., Pleasanton, CA] により製造されたこのタイプのポリカーボネートフィルターは、本発明の装置において首尾よく稼働することが見出された。代表的な製法において、このフィルターは回転によりリボソーム懸濁液の最初の2ないし3回の通過の後に交換しなければならぬ。目的よりは適量、脂質の組成、純度および濃度などのような変換、ならびに用いられた圧力および流速に依存する。

本発明によるユニラメラリボソームの調製において最も重要なパラメーターは、フィルターの通路のサイズである。例えばフィルターの孔径が有意に約100nmより大きい、例えば孔径が約200nmであるとする、MLVをどんなに多くの回数フィルターを通過させても、マルチラメラリボソームからユニラメラリボソームを製造することはできないということが見出された（下記実施例2を参照のこと）。従って、約100nmに等しいかまたはそれより小さな孔径を有するフィルターのみが、本発明のこの見地に関して用いられ得るものである。

以下の実施例6において例示するように、製造されたユニラメラリボソームのサイズは用いられたフィルターの孔径に依存し、通常平均直径は孔径よりも小さなものとなる。もし所望されるならば、リボソームの平均直径は、その過

剰容量 [trapped volume] (リン脂質1μmol 当りのμ²) と同様に、上記に述べた凍結解凍法を用いて容易に増加させることができるものである（下記実施例4をまた参照のこと）。重要なことは、この方法は、磨擦、洗浄剤またはその他の無関係な物質の使用を含まないものであるため、リボソームサイズにおける増加は、汚染および変質の問題を惹くことなく行なわれる。ベシクルのサイズおよび捕獲容量はまた、脂質組成などのような系の他のパラメーターを変化させることにより操作することができる。

所望されるユニラメラリボソームを製造するのに必要とされるフィルターを通しての通過の回数は、フィルター孔径（孔径、粗度および幾何）およびリボソームが形成される物質に依存する。下記の実施例2によって例示されるように、二つ積重ねられた100nmの孔径を有するフィルターを通しての5回またはそれ以上の通過は、ユニラメラリボソームを得るために代表的に要求されるものである。より少ない通過はより小さな孔径に必要とされるであろう。例えば30nmおよび50nmフィルターでは、2〜4回の通過が、実質的にユニラメラリボソームの集団を製造するために通常十分なものである（下記実施例6を参照のこと）。また、単に該集団のラメラ度を減じることが目的であれば、実質的にユニラメラ性を産するよりもかなり少ない通過が必要とされる。どのような特定の系に関する通過の適切な回数も、いつ所望の程度のラメラ度が達成されたかを

決定するために単に仕上げられたリボソームをサンプリングすることによって当業者により容易に決定され得る。

本発明の単一モードの見地に關して、フィルターの孔径は、最終的な集団の平均直径の第1決定要因である。通常、約15〜50nmの範囲内で、平均直径は孔径にほぼ等しいものである。しかしながら、約100nmより小さな孔径に關しては、該集団の平均直径は、用いられた特定の孔径にかかわらず、半導性光散乱により測定して約75nmで安定する傾向にある。上記に述べたように、約100nmより小さな孔径に關しては、仕上げられたリボソームは、最初の集団のラメラ性にかかわらず実質的にユニラメラであることが見出される。100nmより大きな孔径に關しては、マルチラメラリボソームはマルチラメラをとりまたユニラメラリボソームはユニラメラをとどめる。

実質的に単一モードの集団を製造するために必要とされるフィルターを通しての通過回数は、フィルター特性（孔径、粗度および幾何）およびリボソームが形成される物質に依存する。ある場合においては、二つ積重ねられたポリカーボネートフィルターを通しての3〜5回の通過は、単一モードの分布を製造するのに十分なものである。一般的な割合として、二つ積重ねられたポリカーボネートフィルターを通しての25回の通過は、ほとんどのリボソーム構築物において所望される単一モードの分布を製造するものである。どのような特定の系に関する通過の適切な回数も、

何時実質的な単一モード性が達成されたかを決定するために単に仕上げられたリボソームをサンプリングすることによって当装置によって容易に決定され得る。

リボソームの単一モードの、ユニラメラな、あるいは単一モードかつユニラメラな葉膜を製造するためのリボソームのフィルターを通しての通過は、減圧下に行なわれる。種々の程度の圧力が製造されるべきリボソームのタイプおよび組成、用いられた装置の構造の特性、およびリボソームが製造されるべき速度に依存して用いられ得る。

最大圧は通路フィルターを保持するために用いられた支持体の孔縁によって限定される。約30ミクロンの孔径を有するフィルター支持体に関しては、約1000〜7000psiの圧力の範囲が首尾よく働くものであることが発見された。これらの圧力は、完全なリボソームを製造し、高い密度（二つ積重ねられた孔径100nmを有するポリカーボネートフィルターに関して20〜60cc/分の値）を与え、そして均質なサイズ分布、例えば100nmフィルターに関して孔径50〜100nmのリボソームを製造するものである。30ミクロンよりも小さな孔径を有するフィルター支持体に関しては、より高い圧力が使用され得る。

フィルターを通しての通過の回数に関して、ある特定の系に最適な圧力は、仕上げられたリボソームが実質的に完全なものであるか、また所望される単一モードの分布および/またはユニラメラ性を有しているかどうかを決定する

特表昭61-502452 (10)

ために仕上げられたリボソームを調べることによって当装置により容易に決定されることができ得る。

100〜700psiの範囲の圧力はまた、顕著なフィルターの目詰まりを起こすことなく、1cc当りリン脂質約300nmolの量の脂質濃度を有する溶液の押出しを許容するものであるために好ましいものである。ポリカーボネートフィルターを用いる先行技術のサイズ排正法は、100psiよりも小さな圧力を使用したものであり、そしてそれゆえ、50nmol/ccの脂質濃度に限定された。高い脂質濃度の使用は、本発明に関して30%のオーダーの崩壊効率となる。20cc/分およびそれ以上のオーダーの迅速な押出速度は、300〜500psiの範囲の圧力が用いられた場合このような高い脂質濃度に関してなお達成されるものである。

20〜60cc/分程度の流速は、本発明によって達成される最大流速を表わすものではなく、単に押出された物質の都合よい速度に顕著な速度を表わすに過ぎない。最大流速は、脂質の濃度、試料の粘度（すなわち、1度ないしそれ以上の回数押出しされたか否か）、用いられる圧力、および脂質それ自体の状態に依存する。例えば、「ゲル状態」の脂質は押出しすることができない。このような脂質（例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC））は、押出プロセスを遂行する前に、これらのグルー転移温度（DPPCでは41℃）以上に加熱する必要がある。

増加された圧力で、押出しは非常に迅速となし得る。例えば50nm/μmホスファチジルコリン（EPC）の5cc/分流速は500psiで100nm孔径のフィルターを通して2秒以内で押出しされ、これは少なくとも150cc/分の流速に一致するものである。この速度は、より高い圧力または温度によってさらに増加されるであろう。

本発明の実施に好ましい装置が第1A図および第1B図に示される。第1A図に示すように、フィルター6を通して押出されるべきリボソーム懸濁液4は、注入口8より圧力室2中へ導入される。この注入口はまた解放バルブを備えている。圧力室2は、例えばボルト14等により密封される上部材10および下部材12から形成される。これらの部材とフィルター6間のシールは、Oリング16により与えられる。好ましくは、この室は、装置からの懸濁液の押出しが容易的に観察できるように透明なプラスチックでつくられていることが望ましい。フィルターは、腔2内でフィルター支持体18により支持されている。実施において、フィルター6を形成するものとして二つ積重ねたポリカーボネートフィルターを使用することが都合のよいことであることが発見された。

圧力が、圧力源、例えば高圧窒素タンク（図示せず）などに接続された導管20により室2へ供給される。導管20は室2内での圧力を調整するためのバルブおよびレギュレーター22を含むものである。フィルター6から押出さ

れた物質は、導管24により室2より除去されそして受容器26中に集められる。導管26へ集められた後、押出された物質は、リボソームの最初の葉膜の単一モード様および/またはユニラメラ性を実質的に増加させるのに十分な回数、リボソームの最初の葉膜がフィルター6を通過するまで、注入口8より室2へくり返しもどされる。

第1B図は、押出物の構造が部分的に自動的化されている第1A図の装置の変更を示すものである。この図において示される装置は以下のようにして使用される。

最初に、フィルター6が、横切りされたリテーナー栓5、フィルター支持体ハウジング6およびOリング16をアルミニウムハウジング7より取り除くことにより装置内に取付けられる。フィルターは次に、フィルター支持体上に敷きられ、そして外部のアルミニウムハウジング13内に入れられた内側のプレキシガラス（flexiglas）（商標名）製ハウジング11に対してOリング16が圧縮されるまで栓5を締めることによって部分を再密封する。もし所望ならば、多孔性の脱水剤（図示せず）をフィルターの下に置くこともできる。

試料が次に、腔2/再循環/排出バルブ15を装置/排出管17が入口19に一直線上に整列するまでまわすことにより、そして圧力/真空バルブ23を通気孔25が出口21に一直線上に整列するまでまわすことにより、装置3中に充填される。試料は次に装置/排出管17を通過して受

室中へ導入される。最も都合よくは、これは装填／排出管 17 に、短い長さの可屈性の管と皮下注射器を接続することによりなされる。

いったん受室 3 中へ原料が完全に装填されれば、移動バルブ 27 を押し下げることにより原料は圧力室 2 へ移される。さてこれで原料は、フィルター 6 を通しての押出しの準備がととのっている。押出しを行なうために、圧力／通気バルブ 23 は、ガス入口 31 が圧力口 33 と一直線上に整列するまでまわされ、そして装填／再循環／排出バルブ 15 は、該バルブ 15 内に形成された再循環口 37 が一方の端部において入口 19 とまた他方の端部においてバイパス口 29 と一直線上に整列する位置にまわされる。ガス入口 31 は、その装填バルブを動かすレギュレーターを備えた外部の高圧ガス源、例えばバルブを動かすレギュレーターを備えた高圧タンク（図示せず）に接続することにより供給される。

圧力が次に圧力室 2 へ適用され、原料が、フィルター 6、バイパス口 29、再循環口 37 および入口 19 を通ってこの室から受室 3 へと通過することが起こる。これは、フィルター 6 を通しての原料の 1 回の押出しをなすものである。圧力室 2 から受室 3 への流れは、プレキシガラスハウジングを通して同様に確認することができ、そして適用される圧力は、原料を流送するために調整される。

いったん原料の全てが受室 3 に移されたならば、外部の

特表開 61-502452 (11)

圧力室上のバルブは閉じられ、また圧力／通気バルブ 23 は、最初に通気口 25 が出口 21 と一直線上に整列するように、そして次に圧力口 33 と一直線上に整列するようにまわされ、これによって受室 3 および圧力室 2 の双方の通気がなされる。さて原料は、移動バルブを押し下げることにより、圧力室 2 へ再導入される。圧力室 2 中の原料にて、押出しプロセスは、上記に最初の押出しに似て述べた手順に従って繰返される。原料が受室にある間および両方の室が通気された間に、所望ならば、上記に述べたような手順に従って新しいフィルターを取付けることができる。

受室－圧力室－受室サイクルが所望された回数繰返されたならば、原料は、最終にガス入口 31 を出口 21 に、また装填／排出管 17 を入口 19 に一直線上に整列させ、次に圧力を外部の圧力源から系にかけることによって、装填／排出管 17 を通って装置より排出される。実施においては、排出の終わりにおける高いガス圧をなくすために、外圧は、すべての原料が室 3 よりも出てしまう前に止められる。装填／排出管 17 を回いるほかにも、アルミニウムハウジング 7 から切取られたリテーナー栓は、フィルター支持体ハウジング 9 およびリング 16 を取りはずし、そして次にサンプルが圧力室中にさらに装填の底部の外に流れるように移動バルブ 27 を押し下げることにより、原料はまた除去されることができる。

所望ならば、第 1 図に示される装置あるいは同等の装置は、完全に自動化されたプロセスをおこなうために、周知の自動操作装置装置および制御装置を備えることも可能である。また、原料の温度を用いられる原料のグルー液品転移温度以上に保ち得るように、用いられるどの装置の圧力室も、ウォータージャケットあるいは同様の器具を用いて加熱されることができる。

ある程度に限定することを意味することなく、本発明は以下の実施例によりさらに詳細に述べられる。以下に述べられる種々の実施例に共通する物質と方法は次の通りである。

物質と方法

原料

卵ホスファチジルコリン (EPC) および大豆ホスファチジルコリン (SPC) は標準的製造 (シングルトンら、ジャーナル オブ アメリカン オイル ケミカル ソサエティ, 42: 53 (1965 年) [Singleton, et al., Journal of American Oil Chemical Society, 42: 53 (1965)] を用いて単離された。相応する経路のホスファチジルエタノールアミン (PE) およびホスファチジルセリン (PS) は EPC および SPC から調製され、卵ホスファチジルエタノールアミン (EPE)、大豆ホスファチジルエタノールアミン (SPE)、卵ホスファチジルセリン (EPS) および大豆ホスファチジルセリン (SPS) が調製された

(コンフュリス、ビー、とデアル、アール、エフ、エイ (1977 年) バイオケミカル エト バイオフィジカ アクタ, 448: 36-42 [Confurius, P. and Zwaal, A.F. A. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 448: 36-42]) を参照のこと。)。大豆油からの脂質は、SPC 中の高いリノール酸含有量によって、EPC から誘導されたものと比べてかなりより不飽和なものであった。(チールコック、シー、ビー、エス、とチュール、アール、(1981 年) バイオケミカル エト バイオフィジカ アクタ, 641: 199-201 [Tilcock, C.P.E. and Cullis, P.M. (1981) Biochim. Biophys. Acta, 641: 199-201]) を参照のこと。)。すべての脂質は、薄層クロマトグラフィー (TLC) により測定される純度 99% 以上であった。膽性リン脂質 (PL) は、ホープ、エム、ジェイ、とチュール、アール、(1980 年) バイオケミカル エト バイオフィジカ アクタ, 62: 846-852 [Hope, M.J. and Cullis, P.M. (1980) Biochim. Biophys. Res. Commun., 92: 846-852] 中に述べられるようなネトリウム塩の形態へ転化された。コレステロール (シグマ、セントルイス [Sigma, St. Louis]) はさらに精製することなく用いられた。

脂質濃度の測定

脂質濃度 [trapped volume] を測定するために、²²N a または ¹⁴C-イリスリン (エヌイーエス、カナダ [NEN, Canada]) 1 μ Ci の存在下に行なう以外は、下記実施例

特表特61-502452 (12)

1に述べる製造法に従ってマルチメラバシクルが調製された。ユニラメラリボソームは次に、また実施例1の製造法に従い、マルチメラリボソームより調製された。

1つの部分標本(アリコット(Aliquot)) (100μl)が、次に1mlディスプレイシリンジ中に充填されたセファデックスB-50 [Sephadex B-50] カラム上に装填され、そしてバシクルは、500×gで3分間のカラムの遠心分離により溶離された。ピック・ユー、(1981年) アーチ、バイオケム、バイオフィス, 212: 186~194 [Pick, U. (1981) Arch. Biochem. Biophys., 212: 186-194] を参照のこと。²²Naの場合、これはすべての分離されなかった物質の除去に十分なものであった。しかしながら、すべての濃縮されなかったイヌリンを除去するために、この手順がもう一度繰返される必要がある。フルトラゲル [Ultrage] カラム (LKB-A 0434) を通しての当向通過が用いられた。溶離された物質の部分標本が、ボクチャー、シー、ジェイ、エフ、。バン・ダント、シー、エム、とプリース、シー、(1981年) アナル、chim. Acta, 24: 203~204 [Bettcher, C.J.F., Van Genn, U.H. and Pries, C. (1981) Anal. Chim. Acta, 24: 203-204] の方法に従って脂質リンに関して検定され、濃縮された²²Naは、バックマン8000ガンマカウンタ [Bockman 8000 gamma counter] を用いて測定されそして調整された¹⁴C-イヌリンはフィリップスPW-4700数値

シンチレーションカウンタ [Phillips PW-4700 liquid scintillation counter] を用いて評価された。前記容量はそしてリン脂質1μmol 当りの脂質容量のμMとして算出された。

³¹P 核磁気共鳴

³¹P NMRは、バシクル調製物がユニラメラである程度の示唆を与えるために用いられた。特に、外部媒体に懸するリン脂質からの³¹P NMR信号を、検知以上に上げるのに十分な値(5mM)で、Mn²⁺がバシクル分散液(3ml、直径15mmのNMR管中の30~60μmol / mlリン脂質)に添加された。バシクルがラージでかつユニラメラである場合、信号の約50%がMn²⁺の添加後も残っているべきである。バシクルのMn²⁺に対する非透過性は、信号減衰の時間経過に伴ない、調査されたPQ系に関するものが数日の間隔にわたって安定であることが見出されたことにより示された。スペクトルは、81MHzで操作してブルーカーWP200NMRスペクトロメーター [Bruker WP 200 NMR spectrometer] を用いて得られた。1000回の測定に相当する累積を却誘導デケイ [accumulated free induction decay] が、15μsec 30° 脈励磁振幅、ゲートプロトンディカップリングおよび20kHz 掃引線を用いて得られた。50Hzスペクトル線広がりに対応する指数減衰がフーリエ変換の前に適用された。信号強度

は、乗算のために、補出し、トリフェニルホスフィット (NMR管における微小なセントラルキャピラリー中) でのスペクトルを計算することによって測定された。

バシクルサイズ分布の測定

実施例1~7および実施例8の一部に関するバシクルサイズ分布が、フリーズフラクチャーによって測定された。バシクル調製物は、グリセロール(25重量%)と混合されそしてフロンソール [slush] 中で凍結された。試料はバルザース ピエイスフ 4000D [Balzers BAF 4000] 装置を用いて断断し複製し、そしてレプリカの電機鏡写真がフィリップス400 [Phillips 400] 電子顕微鏡を用いて得られた。バシクルサイズ分布は、バン・ベネティエら、(1980年) ジェイ、ミクロス, 119: 401~408 [van Venetie et al., (1980) J. Microsc., 119: 401-408] の手法に従い5%シャドウイングされ分割バシクルの面積を計算することにより測定された。

実施例8の一部および実施例9~10に関するバシクルサイズ分布は、動的光散乱あるいは光子相関分光法としても知られる弾性光散乱によって測定された。

当分野において公知であるように、この技法は、懸濁バシクルの試料を通して、例えばヘリウム-ネオンレーザーによって作られた光などの干渉光を通過させ、そしてバシクルにより散乱された光の強度における時間依存変動を測定することを含むのである。このデータから自己相関関

数が算出される。理論的に示され得るように、この自己相関関数は、試料中のバシクルの散乱係数に直接関係のあるものであり、またバシクルの流体力学半径である。従って、異なるバシクルサイズ分布は異なる自己相関関数を生むものである。

実際には、能一の検体分布は、自己相関関数から直接的に得られない。むしろ、分布はバシクルに関して推定され、そして決定は次に、計算データより導出された自己相関関数がどのようにうまく、試料中のバシクルが事実上分布を推定したとする場合に生み出される自己相関関数と一致するかに従って行なわれる。

特に、バシクルの散乱係数の強度計算された分布が、第一モードのガウス分布であると推定される場合、2次多項式、すなわち最大t²までのそのべきにおける多項式が正確に自己相関関数の自然対数に適合する。ディー、イー、コッペル、ジャーナル オブ ケミカル フィジクス, 57: 4814 (1972年) [D.E.Koppel, Journal of Chemical Physics, 57: 4814 (1972)] を参照のこと。従って2次多項式、すなわち2次式が、実際に特定の試料に関する自己相関関数の自然対数に適合する程度は、試料中のバシクルの散乱係数が第一モードのガウス分布を有する程度の正確な尺度である。当分野において用いられているように、この手法は、しばしば自己相関関数のセミュラント分析と呼ばれる。

特表昭61-502452 (13)

当分析において公知であるように、1) 自己相関関数の自然対数を決めること、2) 2次多項式を自然対数に適合すること、および3) この多項式のこの対数への適合性の良好さを決めることは同様な事である。従ってガウス分析アプローチは、現在バシクルの範囲を特徴づけそして比較するのに最も実践的な方法であり、そしてそれゆえ、本発明の単一モードの発現に関連して本明細書中に用いられるアプローチである。

特に、これらの発現によると、リボソームの集団は、その自己相関関数の対数が2次多項式に極めて一致する割合、実質的に「単一モード性」であると知られる。以下に表わされる実施例において、自己相関関数は、ニコム・モデル 200 レーザー・パーティクル・サイザー [Nicom Model 200 Laser Particle Sizer (ニコム・インストゥルメンツ・インコーポレーテッド、サンタ・バーバラ、カリフォルニア州 [Nicom Instruments, Inc., Santa Barbara, California])] を用いて得られた。この装置は、曲線を合わせるための最小二乗の標準的方法を用い、自己相関関数と2次多項式により予想された値との間の偏差から誘導された χ^2 としての適合性の良好性を報告するものである。0~2の範囲の χ^2 値は通常単一モードガウス分布によるデータの良好な適合性を示すものであり、一方、 χ^2 の高い値は、貧しい適合性を示すものである。

良好な適合性に関して、分布の標準偏差の評価は、該多

項式の2次項の計数の二乗根から誘導され得る。良好な適合性を有する分布に関して、この評価は実施例において報告され、一方貧しい適合性に関しては、評価の値は導出され得るが、このような値は実際に標準偏差の評価として与えることができないので評価は報告されない。

その他の化学品

イヌリン、過ヨウ素酸、 α -塩化ナトリウム、テラミン、G-25セファデックス [G-25 Sephadex]、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウムおよびコレステロールは、シグマ [Sigma] から得られた。ウルトロゲル A034 [Ultragel ac31] はファラマシア [Pharmacia] から得られ、キャリアフリー-Na¹²⁵I (100mCi / ml) はアメルサム [Amersham] により供給されそしてアイオドゲン [Iodogen] はペールス [Pierce] から得られた。その他の化学品のすべては分析級のものであった。

実施例

ユニラメラリボソームの調製

この実施例は、本発明の界面法を用いるラージユニラメラバシクルの調製を示すものである。言及の安易化のために、この方法に従い調製されたリボソームは、以下、銀字部「LUVET」、すなわち抽出技術によるラージユニラメラバシクル [Large Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques] と呼称される。

ラージマルチラメラバシクル (MLV) は、以下のような周知のプロセスによって調製された。最初、クロロホルム中に溶解された脂質が、乾爆されて試験管の内側のフィルムとして析出された。MLVは次に、単に150mM NaCl、20mM HEPES、pH 7.5の水相緩衝液を試験管へ添加し、渦動混合により脂質を水相することにより形成された。

得られたMLV分散液 (2~10ml) は、次に1000nm孔径を有する2つ構成された膜壁25nmポリカーボネートフィルター (ヌクレポア、インコーポレーテッド、プレザントン、カリフォルニア州、カタログ番号110005 [Nucleopore, Inc., Pleasanton, California, Catalog #110005]) を備えた、第1A図に示した装置の圧力腔中へ移された。空室圧が高圧 (0~400psi) レギュレーターを備えた標準ガスシリンダーを介して該室へかけられた。バシクルは所定20~60ml/分となる100~700psiの圧力を用いてフィルターを通して押出され、そして集められて再注入された。抽出手法のないしそれ以上の面数の検出は、フリーズフラクチャーにより計測して約70nmの直径を有するラージユニラメラリボソームの製造をもたらすものであった。再循環を含む全抽出プロセスは、15分ないしそれ以下が要するものであった。

以下の実施例は、抽出法により製造されたリボソームにおけるサイズ、ユニラメラ性、捕獲容量、捕獲効率および

び種々のリボソーム組成の影響を詳細に述べるものである。また、捕獲容量における凍結解凍法の影響およびフィルター孔径の脂質がまた例示される。

実施例2

フィルター孔径の限界

この実施例は、ユニラメラリボソームの製造におけるフィルター孔径の限界、特に約100nmより小さいかまた等しい孔径を有するフィルターを用いての脂質を示すものである。

EPG MLVが実施例1に述べた製法に従って調製され、そして次に100および200nmの孔径を有するポリカーボネートフィルターを通して幾度か通過させた。得られたリボソームのユニラメラ性は、上述の³¹P NMR技術を用いて測定された。結果は第2図に示される。

この図に示すように、200nmフィルターを通過したバシクルに関しては、該フィルターを5回通過後に信号強度は約5%に下降し、そしてその後ほぼ一定を維持する。一方、100nmフィルターのものに関しては、5回ないしそれ以上の通過の後に信号は約50%に下降した。

約50%への信号強度における下降は、リボソームが実質的にユニラメラなものであることを示し、一方わずから5%への下降は実質的なマルチラメラ性を示し、これらの結果は、100nmフィルターは望まれるユニラメラリボソームの製造において成功し、一方200nmフィルターは、

特表昭61-802452 (14)

フィルターを通しての通過の回数にかかわらずマルチラメラリボソームの顕微鏡像を製造することを意味するものである。

この結論は、第3図に示したフリーズフラクチャー顕微鏡写真図によって確かなものとされる。この図に示されるように、SPC、SPC-SPS (1:1) およびSPB-SPS (1:1) から100nmフィルターを用いて形成されたベシクル (それぞれ第3 (a) 図、第3 (b) 図および第3 (c) 図) は、偽方のラメラの欠けを示すものである、有数の数の横断面を示さないもの (0、1%未満) を示すものであった。反対に、横断面は、200nmフィルターを通して製造されたSPCベシクルに関して著明に観察できるものであった (第3 (d) 図)。

これらの結果は、本発明において、ユニラメラ性は、100nmあるいはそれ以下のオーダーの孔径を有するフィルターの使用に依存するものであることを明らかに確立するものである。

実施例3

LUVE工法、捕獲容量およびユニラメラ性

この実施例は、100nmフィルターを使用した場合に本発明の製法は、種々の脂質成分に関するLUVEの比較的均質な集団の製造という特徴のある結果に終わることを示すものである。ベシクル直径および捕獲容量は、上記に述べた方法により測定された。結果は下記の第4図および第

5) におけるベシクルを形成するために用いられた場合、マルチラメラベシクルが形成され、一方、本発明の製法および同様の面質成分では、実質的にユニラメラベシクルが形成されたことを本発明の一貫性に関して注目することは興味深いことである。

第4図に示されるベシクル直径分布は、1) リン脂質分子当りの領域、例えば0、6nm² (シェーレン、エイチ、ルードルフ、エス、フینگルスティン、エム、コルマン、ギーおよびウエイスマン、ジー、(1976年) バイオチミカ エト バイオフィジカ アクタ, 532: 137 ~ 153 [Schieren, H., Rudolph, S., Finkelstein, R., Coleman, P. and Weissman, G. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 532: 137 ~ 153] を参照のこと。)、2) ニ酸脂質、例えば4nm (ブローロック、エイ、イー、(1982年) バイオチミカ エト バイオフィジカ アクタ, 650: 167 ~ 207 [Blaurock, A.E. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 650: 167 ~ 207] を参照のこと。)、および3) ベシクルがユニラメラであることを仮定することによって、捕獲容量に関するおよび内側単一膜リン脂質の量に関する釋出値を決定するために用いられるものである。これらの釋出値は、存在するユニラメラベシクルの割合を決定するために、次に実験的に観察された捕獲容量および内側単一膜リン脂質の量と比較されることができる。

第4図中に示される (側面) ベシクルサイズ分布に関する

1表に示される。

第4図における側面の仕様は、実験例1に同じに調製されたMLVを2つの (極端な) 100nm孔径フィルターを通して10回通過させることによって複製されたSPC LUVE工法に関して計測されたベシクル直径を示すものである。第1張は、これに關するおよび他の脂質組成に関する計測された平均直径および平均捕獲容量を複製形態において示すものである。

比較のために、EPC LUVEが、ユニラメラベシクルを製造するのに一般的に受け入れられている2つの製法 (オクテルグリコシド純淨製造法および逆相蒸発) によって調製され、そしてこのように製造されたLUVEが次に2つの (極端な) 100nm孔径フィルターを通して10回釋出された。ミンス、エル、ディー、ザンビイ、ジー、ノザギ、ワイ、タンフォード、シー、およびレイノルズ、ジェイ、エイ、(1981年) バイオケミストリー, 20: 833 ~ 849 [Mins, L.E., Zambelli, G., Nozaki, Y., Tanford, C. and Reynolds, J.A. (1981), Biochemistry, 20: 833 ~ 849] およびスザカ、エフ、とババハジョーロス、ディー、(1980) アン レフ バイオエング, 9: 467 ~ 508 [Suzuka, F. and Papahadjopoulos, D. (1980) Ann. Rev. Biochem., 9: 467 ~ 508] を参照のこと。これらの比較対照の結果もまた第1表に示される。(オクテルグリコシド製法がEPC/コレステロール (1:0、2

るこのアプローチに続き、このようなベシクル集団 (ユニラメラである場合) は、最初の超厚強度の約43%の「内側単一膜」信号強度 (MN²の添加後) を有しているであろうことおよび捕獲容量が約1、6μm²/no1であろうことが決定された。これは、行なわれた仮定の数を考慮して、特に、リン脂質1μmol当りの捕獲容量のμm²として表される捕獲容量に極めて大きな影響を与えることのできるリン脂質1μmol当りの集団の平均における面積性を考慮して、分離されたリン脂質の計測値 (4.0%) および捕獲容量の計測値 (1、2±0、2μm²/no1) に正当に従うものである。

1、6μm²/no1の算出捕獲容量値を第1表に示す実験的データと比較して、SPCおよびEPCより形成されるLUVE工法が期待されたものより小さな捕獲容量を示すこと、一方、ホスファチジルセリンなどのような帯電リン脂質が存在していると、理論的捕獲容量が達成されること が示される。

EPCおよびSPC LUVE工法に関して観察される低い捕獲容量に関する2つの可能性のある理由は、集団中に存在する顕著な数のマルチラメラベシクルがあること、あるいはまたフリーズフラクチャー顕微鏡写真図から推定されたものよりスモールベシクルの存在するより大きな割合があることである。フリーズフラクチャーの結果は、横断されたマルチラメラ系のわずかな%が横断面を示すもので

特表昭61-502452 (15)

あるということを確認したとしても、マルガラメラベシクルの数は非常に少ない(2%未満)ものであることを推測するものである(アール、ジャー、ミラー、ネイチャー、287: 156 (1980) [R.G. Miller, Nature, 287: 156 (1980)] を参照のこと。)。一方、スモールベシクルの数の低い見張りも同様である。

さらに、第1表に示されるように、オクテリグリコシド洗淨液新および洗淨液洗淨により、その後100nm孔径を有するフィルタを流して70%押し出されて、製造されたEPC-LUVに關して計測された捕獲容量は、EPC-LUVETに關して得られた捕獲容量に匹敵するものである。

これらの観察を総合すると、本発明の押出技術によって製造されたベシクルの大きな利点は、ある場合においては、計測捕獲容量が純出値よりも小さなものではあるけれど、ユニラメラであることである。

100nmの孔径を有するフィルタを用いた場合に本発明の製造法、SUVに代替するものとしてLUVを製造することを促進するために、熱安定性研究が16:0/16:0-PC(ジパルミトイルホスファチジルコリン-DPPC)からなるMLVおよびLUVETに導入された。

総脂リン脂質、例えばDPPCからなるSUVは、それらの高圧に屈曲した膜によりゲル-液晶転移温度(T_m)における低域および遷移の広がりを示すことで知られてい

る。この高圧の屈曲は、膜の炭水素領域における増加された無秩序性をまねくものであるゆえに、一時的に相当分はくれないものである(シュウ、ジェイ、アール、バナリ、ユー、ミューラー、エル、およびチャン、エス、アイ(1982年)バイオフィジカ、エト、バイオフィジカ、アクタ、687: 219-225 [Schub, J.E., Banerjee, U., Mueller, L. and Chan, S.I. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 687: 219-225] を参照のこと。)。

本発明により製造されたLUVETが高圧に屈曲した膜から生じる問題をなくすのに十分に大きなものであるか否かを確かめるために、T_m値が実施例1の製法に従って調製されたMLVおよびLUVETに關して熱差分析で計測された。結果は第5図に示される。

この図に示されるように、MLVおよびLUVETは非常に似合ったT_m値を示す。これらの値は、文献中に報告されたものと一致するものである。ラドブローク、ピー、ディー、とチャップマン、ディー、(1969年)ケム、フィジ、リビズ、3: 334-367 [Ladbrooke, B.D. and Chapman, D. (1969) Chem. Phys. Lipids, 3: 334-367] を参照のこと。これらは、マルガラメラ系の温度より約4℃高く広まる広げられたゲル-液晶転移を示す溶媒増強DPPCベシクルについて観察される挙動に直接対比するものである。バン、ギャック、ピー、ダブリュ、エム、デ、クルーイフ、ピー、アルトス、ピー、エイ、エム、エ

ム、ヴァークレー、エイ、ジェイおよびゲ、ギエール、ジェイ(1978年)バイオフィジカ、エト、バイオフィジカ、アクタ、668: 183-191 [van Dijk, P.H.M., de Kruijff, B., Maris, P.A.H.M., Verkleij, A.J. and de Gier, J. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 668: 183-191] を参照のこと。従って、100nm孔径を有するフィルタを用いて本発明の製法により調製されたユニラメラリポソームはSUVよりもむしろ、当然にLUVとして調製される。

本発明の押出しプロセスにより製造されたリポソームの構造完全性を試験するために、150nmに代わり1μmのNaCl濃度を有する緩衝液を用いて、実施例1の製法に従ってLUVETが調製された。調製の後、リポソームはリポソームの膜を横切って大きな透過性を生じさせる黒濁水中へ置かれた。リポソーム透過に關する指示薬としてアレナゾIII [arenazo III] を用いて、本質的に何の透過もこのような苛酷な試験条件下において見られなかった。

実施例4

捕獲容量を増加するための凍結解凍サイクルの使用

この実施例は、本発明により製造されたユニラメラリポソームの捕獲容量を増加するための凍結解凍法の使用を開示するものである。

実施例1の製法に従い調製されたSPCおよびEPC-LUVETは、新しい100nm孔径フィルタを通しての

押し出しを伴う2回の凍結解凍サイクル(液体窒素を用いる)にかけられた。結果には、LUVETがプラスチック膜に入れられ、そしてこの膜が液体窒素中に約7分間置かれた。凍結されたLUVETは次に室温にて水中で約5分間解凍された。解凍された溶液は、凍結-解凍-押し出しプロセスが2回繰返された後、新しい100nmフィルタを通して3回押し出された。

このプロセスに關する観察の結果は、第1表中に与えられる。凍結解凍SPC-LUVETのサイズ分布の形態は、第4図中に与えられる(黒い柱線)。

第4図に示されるように、SPC-LUVETの平均直径は、約200nmほど増加した。このベシクル分布に關する捕獲捕獲容量は、2.2±0.1μl/mlの計測値と極めて一致する2.3μl/mlである(第1表)。

より高い捕獲容量でさえ、100nm孔径フィルタを通しての押し出しによって調製されたLUVETの凍結-解凍、その後の200nm孔径フィルタを通しての押し出し(3〜4回)が10μl/mlモルリン脂質のオーダーの捕獲容量となる大豆PC系を用いて達成された。

実施例5

LUVET捕獲効果

LUV調製後の1つの重要なパラメーターは、これらの捕獲効果である。これは捕獲されるべき作用物質が多くの薬剤の場合のように高圧であるかあるいは低い脂溶性を有

特表昭61-502452 (16)

実施例5

100nmより小さな孔徑を有するフィルターの使用

この実施例には、製造されるリボソームのサイズにおけるおおよび実質的にユニラメラ性を達するために必要とされるフィルターを通しての通過の回数における100nmより小さな孔徑を有するフィルターの使用の効果を示すものである。

MLVが90POを100nm/μmの孔径で用いてまた150nm NaClおよび20nmヘスの緩衝液(0.7, 5)を用いて実施例1の製造に従って調製された。この分散液は、第1A図の装置を用いて、50nmまたは30nmの孔徑を有する2つ積重ねたポリカーボネートフィルターを通して10回通過させられた。射出器を通過して10回通過の後おおよび10回通過の後に部分採本がとられ、上達したようなフリーズフラクチャー顕微鏡写像を作成するために用いられた。試料(1試料25nmのリン脂質、4μm)がまた通過の種々の回数の後にとられ、上達したようなMN²⁺を用いる³¹P NMRにより分析された。結果は第7〜9図に示される。

第7図に示すように、50nmフィルターを通して一度抽出されたベシクルはMN²⁺の増加において³¹P NMR信号の37パーセントを失ない、一方30nmフィルターを通して一度抽出されたベシクルは47.5パーセントを失なった。これは、50nmフィルターを通過したベシクルは、

している場合ならば、特にそうである。

本発明に開示して、全工程のプロセスは、MLVを調製するために用いられる溶液の脂質濃度を単に増加させることによって、製造されたベシクルの比較的低い脂質濃度にもかかわらず、30%のオーダーの脂質濃度を有するよう形成され得るものである。

この効果は、MLVET内に前記された水相濃度のパーセンテージが、実施例1の製造に従って調製されたMLVET(黒丸)および実施例4の凍結-解凍液を用いて調製されたMLVET(白丸)に換する脂質濃度に対してプロットされている第6図において示されている。

300μmol/μlの脂質濃度でのMLVETの調製は、この図に示されるように30%のオーダーの脂質濃度への上昇を与えて、容易に達成される。凍結-解凍サイクルが、200μmol/μlより低い脂質濃度で、脂質2μmol当りの脂質濃度における顕著な上昇を、わずかに与えるものであることに注目することは興味のあることである。同様の観察が、ピック、ユー、(1981年)アーク、バイオケム、バイオフィズ、212: 186〜194[Pick, U. (1981) Arch. Biochem. Biophys., 212: 186〜194]により報告されている。

30nmフィルターを通過して通過したものよりも大きいおおよびまたはよりマルチラメラなものであることを示すものであり、この結果は第8図および第9図に示されるフリーズフラクチャー断像等価図によって確かめられる。これらの図の上の部分(第8A図および第9A図)を比較することは、50nmフィルターを通過して一度通過されたリボソームが、30nmフィルターを通過して一度通過されたものより大きくまた不ぞろいのものであることを表すものである。

10回通過の後、50nmおよび30nmフィルターに関して、³¹P NMR信号強度はそれぞれ53および56パーセントまで下降した。これは、両方のフィルターが本質的に同じサイズのリボソームを製造していたことを示すものである。これは両方の集団が4.4±1.4nmの平均直径、すなわちMLVの直径特性を有することを示しているフリーズフラクチャー断像等価図の分析により確かめられた。第8B図および第9B図によって示されるように、それぞれの場合において、製造された集団は均質なものであった。

第7図の曲線を第2図における100nmフィルターの曲線と比較することは、³¹P NMR信号は、より小さな孔徑を有するフィルターに関してより早く水平なものとなりがちであることを表すものである。従って、射出装置を通してのより少ない通過が、より小さな孔徑のフィルター

に関して実質的にユニラメラリボソームの集団を達するために要求される。

実施例7

ユニラメラリボソームの実体内分布

この実施例は、本発明に従って調製されたリボソームの、内包された[entrapped]物質の生体内分布[in vivo]供給への使用を示すものである。特に、上述の実例1に従い調製された¹²⁵I-チラミール-イヌリン(125[I])を含むMLVETの長手およびその後の生体内分布をラットモデル系に顕し指示するものである。

チラミール-イヌリンは次のようにして調製された。イヌリン(1.0g)が蒸留水90.0ml中に溶解され、そして4℃に冷却され、0.1M過ヨウ素酸1.0μl(新鮮)が添加され、さらに該溶液は暗室中で4℃で15分間培養された。過ヨウ素酸溶液は、イヌリン1モル当り約2%酸化を示す亜硫酸塩によって検定された(ダイアー、ジェイ、メソケス オブ バイオケミカル アナライシス、ビー、グリック[編]第3巻、第111頁、インターサイエンス(1956年)中[Byer, J., Methods of Biochemical Analysis, P. Gluck (Ed.), Vol. 3, p.111, Interscience (1956)]を参照のこと)。反応はBa(OH)₂で中和によって終了され、過ヨウ素酸およびヨウ素酸塩は塩化分組により除去された。上清液にNaOH、PO₄、4.5gおよびチラミン0.55gが添加され、そして0.7

特表昭51-502452(17)

が1.0M HClを添加して7.5へと調整された。続いて、NaBH₄・CN(0.25g)が添加され、そして溶液は容器にて4時間攪拌された。残存するアルデヒド基は、NaBH₄・O₂の注意深い添加により還元され、そして溶液は、27°Cでさらに1時間攪拌された。部分標本(2.5μl)が、減圧下に乾燥され、予めH₂Oで平衡化された1.5×8.0cmのセファデックスG-25カラムに4°Cでかけられた。流速は1.0ml/時間に調整され、面分4mlが検められた。この面分は、27.9nmでの吸光度を観察することによりチラミンに關して検定された。アントロン誘導体誘導体は、ジェイ、エイチ、(1955) ジェイ、バイオ、ケム、212: 335-343 [Ree, J.H. (1955) J. Biol. Chem., 212: 335-343] を参照のこと。)を用いて糖に關して検定された。結合面分は、空白容積[void volume]中に溶解し、そして0.6の一定なチラミン: イヌリンモル比を有するものであった。該付加物はセファデックスG-25カラムにおける再クロマトグラフィーにより測定して、遊離チラミンおよびその他の糖から完全に分離されていた。ピーク面分はイヌリンに基づき80%の収率を与えて濃縮乾燥された。

チラミル-イヌリン付加物は以下のようにしてヨウ素化された。チラミル-イヌリン付加物2.5μlは0.2%のヘバス(2.0ml)、NaCl(1.45M)間7.4(ヘバス緩衝液: HBS)中に溶解され、そしてア

イオドゲン40μlが予めCHCl₃(3.00ml)から抽出された、1.5%緩衝液中へ入れられた。次にキャリア-フリーNa¹²⁵I(4μl)、3.00ml/μlが添加されそして濃縮が濃度で4.5%となされた。溶液が次に1.0M Na₂S₂O₅、0.05M K⁺を含む容器に移され、そして次にHBSで平衡化されたG-25カラム(1×2.0cm)へかけられた。面分(0.5μl)が検められ、そして空白容積(2.5μl)中に溶解する¹²⁵I含有面分は、プールされた。得られたチラミル-イヌリン(¹²⁵I)溶液は、1.0μl/μl¹²⁵Iを含まり、そして、その0.01%未満は遊離チラミンの形態(0.01%未満は、1.2%H₂O₂および0.4%K⁺に形成した場合に抽出可能である。)でありそして99%以上の物質はセファデックスG-25を隔る再クロマトグラフィーにおける空白容積中の1つのピークとして溶解されるものであった。すべての研究において、該物質は製造の2週間以内に用いられた。

¹²⁵Iを装填したリボソームは、上記に述べたような製法を用いて調製された。詳細には、卵ホスファチジルコリン(EPG)3.0μlおよびコレステロール3.0μlがCHCl₃から乾燥された。析かれた脂質フィルムは¹²⁵I-TI 1μlを含むHBS 1μl中に均等に混合により分散された。このようにして製造されたマルチラメラ系は次にN₂圧力(200~400psi)下に2つ検定された

ポリカーボネートスクリーンフィルター(100nm孔径)を通して1.0μl回収された。LUVETの部分標本(0.1μl)は予めHBSで平衡化されたウルトラグラー0.34カラム(1μl)にかけられた。脂質含有面分は、プールされ、そして再クロマトグラフィーは、¹²⁵I-TIの9.7%より多くがベシクル中に「捕獲」されていることを示した。得られたリボソーム脂質、脂質リン型エステル分析および乾燥された¹²⁵I-TIから抽出して0.9μl/μlノリリン脂質の捕獲量を有していた(フィスケ、シー、エイチ、とサブロー、ワイ、(1925) ジェイ、バイオ、ケム、68: 375-379 [Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) J. Biol. Chem., 68: 375-379] を参照のこと)。これらのベシクルの平均半径は70nmであった。¹²⁵I-TIを含むLUVETはHBS 2.00μl中における0.5μmolリン脂質へと希釈され、4°Cで保存されそして製造の2日以内に使用された。

このLUVETが、実験前および実験開始中無制限に食料摂取させた雌性ウィスター [Wistar] ラットに、エーテルを用いて断頭にかかる麻酔をし、そして次に尾静脈を介してLUVET(0.5μmolリン脂質)中に内包された約0.5μmolの¹²⁵I-TIを含む2.00μl HBSを注射することによって投与された。ラットは尿および胆汁が集められる代謝カゴ中に回収された。注射後の種々の時間において、ラットはエーテルで麻酔をかけられ、そ

で大静脈からの採血により採取された。血液は、2.00μl EDTA 2.00μlを含むシリジ中に集められそして回収率は、4.9%血液/100μlラットを測定して約85%であった。心臓、肝臓、腎臓、脾臓および腎臓は除去されそして肺臓中に残っている尿が集められた。肺臓は次に7°Cで9M NaOH 2.00μl中に一晩溶解された。同体溶解後の部分標本および組織の試験が次に¹²⁵Iの存在に關して検定された。

第10図はLUVETの製造からのクリアランスおよびその後の尿中のイヌリンの出現を示示するものである。この図に示されるように、腎臓における内包された物質は注射されたレベルの約40%に迅速に減少され、そしてその後は、非常に低い半減期(約3時間)を有して衰えていく。さらに、注射された投与量のわずかに30%は、3日後においてすらも尿中に痕跡的に見出される。この後者の結果は、¹²⁵I-TIを内包したLUVETの組織吸収および経路を明らかに示すものであった。

尿中の組織分布が第11図に示され、ここにおいて、生体内¹²⁵I-TIの約50%が肺によって捕獲され、約10%が腎臓によって、そして残りが肝臓に見いだされることが示されている。3%未満の¹²⁵I-TIが注射後の経路の時間において、心臓、脾臓および腎臓中に見出された(データは示さず)。

観察された組織分布は、他の方法によって製造されたり

ポソームで以前に精製されたものと同様であり（例えば、アブラ、アール、エム、とハント、シー、エイ、（1981年）バイオチミカ エド バイオフィジカ、ボク、483-503 [Abra, E.H. and Hunt, C.A. (1981) *Biochem. Biophys. Acta*, **155**, 494-503] を参照のこと。）、それゆえに、本発明のリボソームは生体内環境に隣して先行反響のリボソームと同等のものであることが示される。

実施例 8

リボソームの連続精製法

この実施例は、溶剤およびその他の無機物を使用することなく、脂質成分あるいはペレットおよび極微細からの連続的なリボソーム製造を開示するものである。

上述のようにして調製された EPO 100nm が試験管中へ注入され、ヘパースルホン 1.0ml が加えられ、そしてこの混合物が 20℃ で 10 分間静置された。この混合物は 2 分間簡単に混合され、次に 5 分間の静置時間を取り、その後 2 分間混合され、得られた溶液は、100nm の孔径を有する 2 つ極微細なポリカーボネートフィルターを備えた第 1A 図に示す装置の圧力室に入れられた。この装置は、20℃ の温度で、該フィルターを通して 100psi の圧力下で抽出された。使用圧力は 200-300psi のオーダーにあり、そして得られる流速は約 30ml/分のオーダーであった。

得られた製品のフリーズフラクチャー顕微鏡写真図が上

符表 61-502452 (18)

述した手順に従って作製された。製品は、フリーズフラクチャーにより計測して約 70nm の平均直径を有する実質的にユニラメラリボソームの均質な集団であることが見出された。所望ならば、この平均直径は実施例 4 の凍結解凍法を用いて増大されることが可能である。

上述の製法が、100nm フィルターに代えて 200nm フィルターを用いて繰返された。この場合、100psi のオーダーにある圧力が用いられ、約 30ml/分の流速が得られた。リボソームの均質な集団が再度得られたが、この場合集団の実質的な部分は、ユニラメラというよりむしろマルチラメラであった。この集団の平均直径はニコンプモデル 200 レーザー パーティクル サイザー [Nicon Model 200 Laser Particle Sizer] (ニコンプインストルメント インコーポレーテッド、サンタバーバラ、カリフォルニア州 [Nicon Instrument Inc., Santa Barbara, California]) を用いた準弾性光分散により計測されて約 168nm であった。

実施例 9

リボソームの実質的に単一モードの集団の調製

この実施例は、実質的に単一モードの分布を有するリボソームの集団の調製を開示するものである。

ラージマルチラメラベシクル (MLV) が次のような略知のプロセスにより調製された。最初に、上述したように調製された EPO がクロロホルム中に溶解され乾燥されて、

試験管の内側にフィルムとして析出された。MLV は次に、150mM NaCl、200mM ヘパースルホン、5% の水性緩衝液を試験管中に添加し、そして混合により溶解を促進することによって形成された。

得られた MLV 分散液は、次に、200nm の孔径を有する 2 つ極微細な線維 25nm ポリカーボネートフィルター (ヌクレオア、インコーポレーテッド、プレザントン、カリフォルニア州 カタログ番号 116606 [Nucleopore, Inc., Pleasanton, California, Catalog #116606]) を備えた、第 1A 図に示される装置の圧力室中へ移された。この分散液は、該フィルターを通して 20℃ の温度で 25 回押し出された。使用圧力は 100psi のオーダーにあり、そして得られる流速は 30ml/分のオーダーであった。このサイズ調製法は、約 15 分間で完了し、そして得られたリボソームはフィルターを通してこれらの多くの通過にもかかわらず、実質的に完全なものであることが見いだされた。

25 回通過の終了時の集団のサイズ分布は、上述した準弾性光散乱を用いて観察された。結果は、下記第 2 表に示される。

この表に示されるように、該集団は、2 次多式曲線によって良好な適合性が達成されることを示す 1.42 の χ^2 値を有しており、それゆえ、ベシクルの直径係数は単一モードのガウス分布を有していた。この集団に関して導出され

た平均直径は 168nm、すなわち押し出しに用いられた 200nm の孔径より約 15% の小さなものであり、そしてこの平均についての標準偏差はかなり小さい 5.5nm であった。

実施例 10

一連のポリカーボネートフィルターを用いたリボソームの調製

この実施例は、実質的に単一モードのサイズ分布を有するリボソームの集団を得るための一定孔径のフィルターを用いることの堅固性を、漸次する孔径の一連のフィルターに対比させて示すものである。

同じ孔径を有するフィルターを通して 25 回押し出される代りに、次の孔径、すなわち 100nm、80nm、60nm、40nm および 20nm の孔径を有する一連のフィルター (ヌクレオア、インコーポレーテッド、プレザントン、カリフォルニア州 カタログ番号 116616, 116606, 116608, 116607 および 116608 [Nucleopore, Inc., Pleasanton, California, Catalog Nos. 116616, 116608, 116609, 116607 and 116608]) を通して 1 度押し出す以外は、実施例 9 におけるものと同様にして MLV が調製された。この場合、それぞれのフィルターサイズのた単一のフィルターを備えた、第 1A 図の装置が、実施例 9 におけるものと同等に用いられた。圧力、流速およびプロセス温度は実施例 9 におけるものと同一であった。

準弾性光散乱により測定された、この方法において調製

特表昭61-802452 (19)

されたリボソームのサイズ分布は、第2表に示される。この場合、2次多項式がデータに適合しないものであったことを意味する368という巨大な χ^2 が算出され、そしてそれゆえリボソームの結核係数は単一モードのガウス分布を有していないものである。

この結果を実施例9の結果と比較することで、一定数値のフィルターを通してのリボソームの数回通過は、同様のタイプのリボソームの漸減する孔径の一連のフィルターを通しての通過により製造されたものとは著しく異なるサイズ分布を醸くべきことに感ずるものであることが容易に確認される。

本発明の特定の実施態様を述べた例示してきたが、本発明の態様および範囲から逸脱することなく変更がなされ得ることが理解されるべきである。例えば、本発明は、実施例中に開示されたもの以外の種々の膜形成物質および内容物を溶質を用いて実施されることが可能である。同様に、本明細書中に開示した以外の種々の装置が本発明を実施するために用いることができる。特に、その段階のそれぞれが容易に制御可能であるゆえ、本発明の方法は特に完全に自動化された方法への移行に適するものであり、そしてこのような移行は本発明の範囲内に特に包含されるものである。これらの同様な範囲に沿って、他のタイプの膜が、自己相関関数を得るために用いられることができ、そしてその他の統計的アプローチが、自己相関関数がガウス

分布より生成されるタイプのものであるかを決定するために用いられ得る。添加された請求の範囲内に記載された本発明の範囲は、これらおよびその他の変態態様を包含することを意図するものである。

第1表

100nmの孔径を有するフィルターを通しての種々の膜質混合物の吐出により製造されたベシクルの物理特性

膜質	濃度 ^a %	平均直径± 標準偏差(nm)	平均膜厚± 標準偏差(Å/μm ²)
EPC	10	71±24	1.1±0.1(64)
SPC	10	70±23	1.2±0.2(13)
EPC/EPS(2:1)	10	73±25	1.5(2)
SPC/SPS(2:1)	測定せず	73±20	2.4(2)
SP2/SPS(2:1)	測定せず	79±36	2.0(2)
SPS	測定せず	測定せず	2.3(2)
EPS	測定せず	測定せず	2.2(2)
EPC(凍結乾燥)	51	77±10	2.2±0.5(17)
SPC(凍結乾燥)	48	94±26	2.2±0.1(12)
EPC (オクチルグリコシド)	40	測定せず	1.2±0.1(3)
SPC(添加蒸気)	50	測定せず	1.2(2)

^a 5mM Na^{2+} の存在において残存する³¹P NMR信号の強度。

^b Å/μm² リン脂質(溶媒内)の実験的値

第2表

透過性光分散により計算されたリボソーム集団の特性^a

	一定孔径	漸減する孔径
平均直径(nm)	163	630
χ^2	1.42	368
標準偏差(nm)	55	**
膜質濃度(nm/Å)	10	10

^a 平均直径、 χ^2 および標準偏差に関する値は、ニコンプ モデル 200 レーザー パーティクルサイザー(ニコンプ インストルメンツ、インコーポレーテッド、サンタバーバラ、カリフォルニア州 93111)を用いて測定された。次の入力パラメーターが用いられた：溶媒…20℃；粘度…1.002センチポイズ；屈折率…1.330；レーザー波長…632.8nm；および角度の1/2 の正弦…0.7070。計測のいずれのセットに關しても、装置は遅延ベースラインモードで用いられた。一定孔径の計測(実施例9)に關しては、 9.68×10^6 の総カウント値を生む、 6.33×10^6 BSECのランタイムが用いられ、また1.98 デュケイを有する自己相関関数を与える、20μsecのチャンネル幅が用いられた。漸減する孔径の計測(実施例10)に關しては、 8.01×10^6 の総カウント値を生む、 8.58×10^6 msecのランタイムが用いられ、また1.85 デュケイを有する自己相関関数を与える、10μsecのチャンネル幅が用いられた。

** χ^2 に關して報告がなされない(本文参照のこと。)

特表昭61-502452 (20)

FIG. 1A.

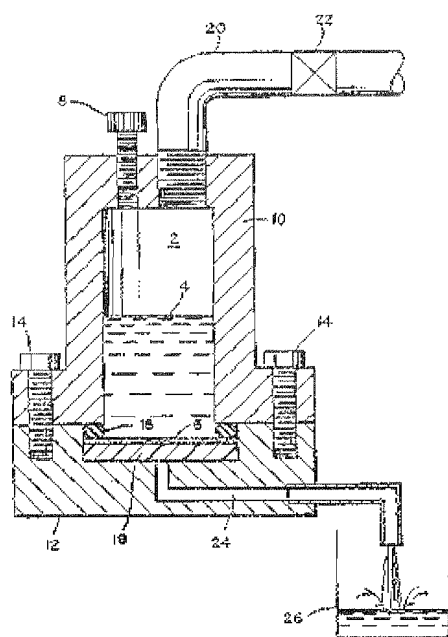


FIG. 1B.

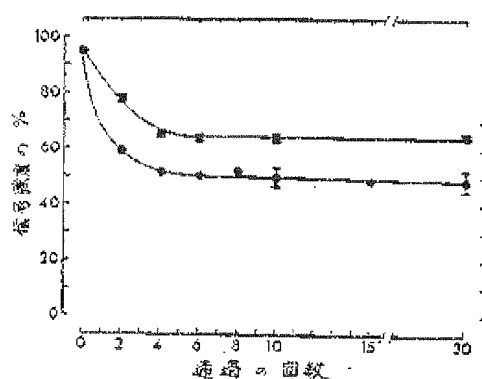
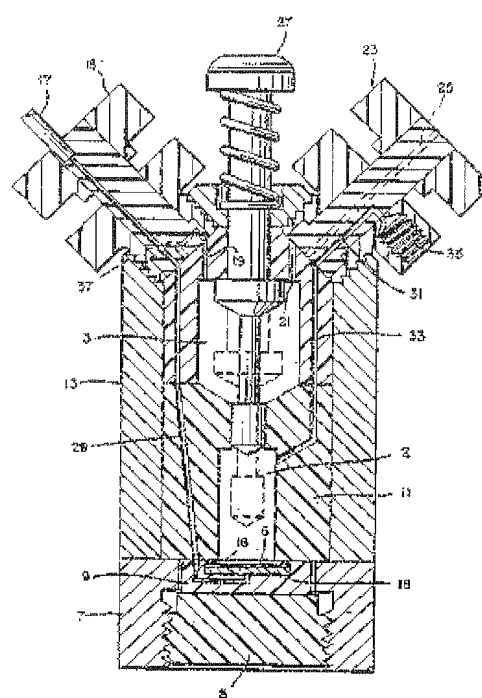
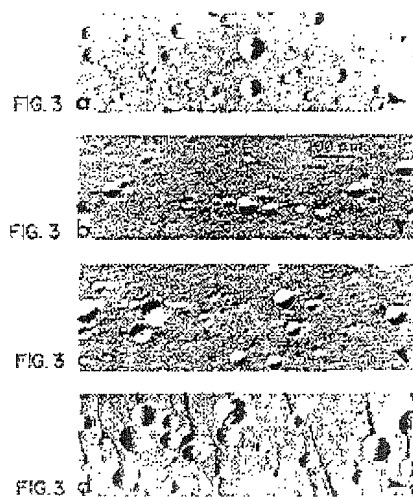


FIG. 2



特表昭 81-502452 (21)

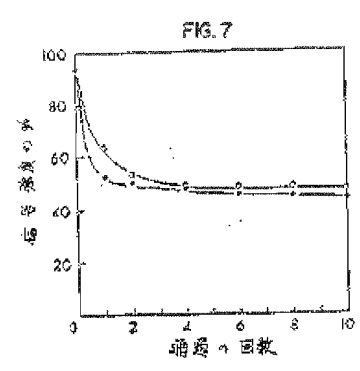
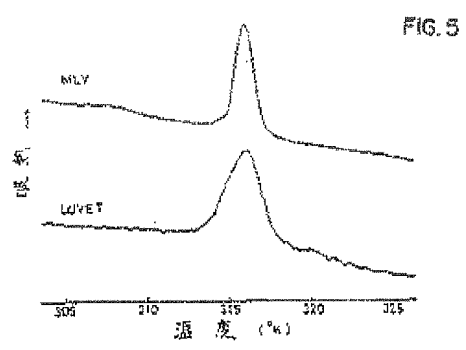
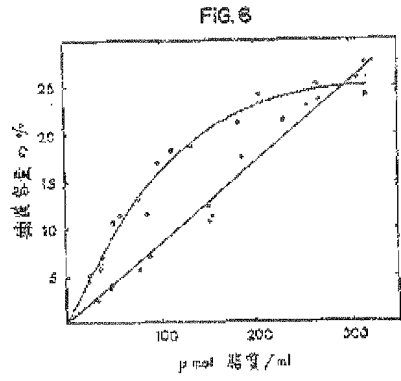
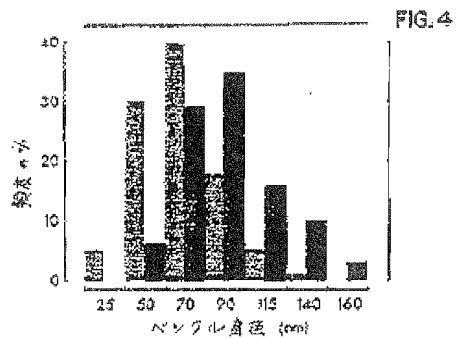


FIG. 8 a

FIG. 9 a

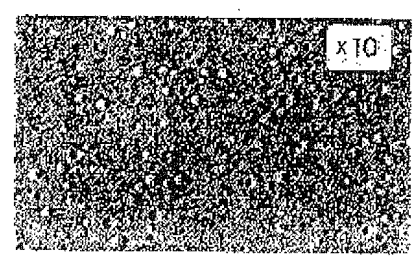
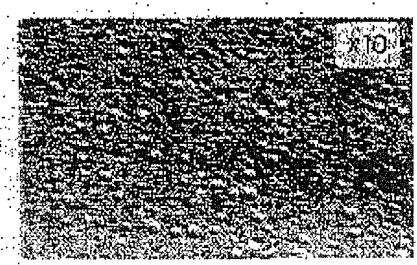
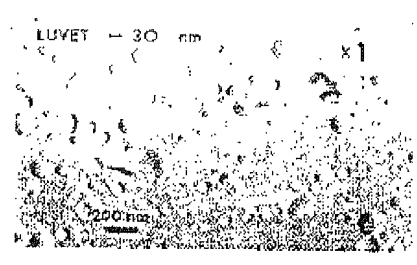
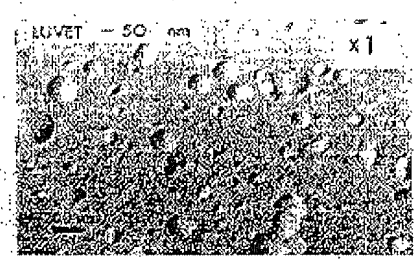


FIG. 8 b

FIG. 9 b

特表昭61-502452 (23)

第1頁の続き

優先権主張

©1984年5月20日⑤米国(US)⑤622690

⑤発明者

ホープ、マイケル ジェイ

カナダ国 ブリテイッシュ コロンビア プイ6アール 2ケイ

2、バンクーバー、ウエスト イレブンス アベニュー 3550

⑤発明者

バリー、マルセル ビー

カナダ国 ブリテイッシュ コロンビア プイ6ティ 1エム

8、バンクーバー、コルベツト クレセント 5516